

Cadherin-Expression während der Odontogenese der Maus

**Dissertation**  
**zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde**

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**  
**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Jonas Wagenknecht**  
**geboren am 15.09.1989 in Meiningen**

**Gutachter**

1. Prof. Dr. Dr. Christoph Redies, Jena
2. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Jena
3. Prof. Dr. Werner Götz, Bonn

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2015**

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	3
2.1 Vorwort .....	3
2.2 Zahnentwicklung .....	3
2.2.1 Leistenstadium .....	4
2.2.2 Knospenstadium .....	5
2.2.3 Kappenstadium .....	6
2.2.4 Glockenstadium .....	7
2.2.5 Bildung der Zahnhartsubstanzen .....	8
2.2.6 Bildung der Zahnwurzel .....	10
2.2.7 Bildung des Zahnhalteapparats .....	11
2.2.8 Zahndurchbruch .....	11
2.3 Cadherin-Superfamilie .....	11
2.3.1 Aufbau .....	13
2.3.2 Mechanismus der Adhäsion .....	15
2.3.3 Funktion .....	16
3. Ziele der Arbeit .....	20
4. Material und Methoden .....	21
4.1 Material .....	21
4.1.1 Chemikalien .....	21
4.1.2 Nukleinsäuren und Enzyme .....	22
4.1.3 Antikörper und andere Proteine .....	22
4.1.4 Plasmide .....	23
4.1.5 Lösungen zum Fixieren und Einfrieren des Gewebes .....	24
4.1.6 Lösungen für <i>In-situ</i> -Hybridisierung und Doppel- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	24
4.1.7 Lösungen für Azan-Färbung .....	28
4.1.8 Stammlösungen .....	29
4.1.9 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software .....	30
4.2 Methoden .....	31
4.2.1 Präparation, Fixation und Einfrieren des Mausgewebes .....	31
4.2.2 Anfertigen von Kryostatschnitten .....	32

4.2.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	33
4.2.4	Doppel- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	34
4.2.5	Azan-Färbung .....	36
4.2.6	Mikroskopie und Erstellen digitaler Bilder .....	37
5.	Ergebnisse .....	38
5.1	Histologische Strukturen der Odontogenese (Azan) .....	38
5.2	Cadherin 2-Expression (Cdh2) .....	40
5.3	Cadherin 4-Expression (Cdh4) .....	42
5.4	Cadherin 6-Expression (Cdh6) .....	43
5.5	Cadherin 11-Expression (Cdh11) .....	45
5.6	Protocadherin 7-Expression (Pcdh7) .....	46
5.7	Protocadherin 10-Expression (Pcdh10) .....	48
5.8	Protocadherin 19-Expression (Pcdh19) .....	49
6.	Diskussion .....	51
6.1	Sind Cadherine an der Ausbildung der asymmetrischen Morphologie und Topographie des Zahnes beteiligt? .....	51
6.2	Die Expression von Cdh6 weist auf eine molekulare Wechselwirkung zwischen Kronen- und Wurzelmorphologie hin .....	53
6.3	Das dynamische Expressionsmuster der Protocadherine und seine möglichen Funktionen bei der Odontogenese .....	55
6.4	Cadherine könnten durch die Expression in Epithel und Mesenchym an der Regulation reziproker Signalwege beteiligt sein .....	56
6.5	Regulieren Cadherine die Ameloblasten- und Odontoblastendifferenzierung, indem sie Zelladhäsion und Zellpolarität vermitteln? .....	58
7.	Schlussfolgerungen .....	63
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	65
9.	Anhang .....	75
9.1	Publikationshinweis .....	75
9.2	Lebenslauf .....	75
9.3	Danksagung .....	76
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	77

## **Abkürzungsverzeichnis**

äEZ	äußere Epithelzellen
AM	Ameloblasten
AP	alkalische Phosphatase
ap.	apikal
äSE	äußeres Schmelzepithel
Cdh	Cadherin
dest.	destilliert
DISH	Doppel- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
dZME	determiniertes Zahnmesenchym
E	Embryonaltag
EC	extrazelluläre Cadherin-Domäne
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
gZL	generelle Zahnleiste
HES	Hertwig-Epithelscheide
iEZ	innere Epithelzellen
iSE	inneres Schmelzepithel
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
kor.	koronal
ling.	lingual
OD	Odontoblasten
OK	Oberkiefer
OT	Objektträger
P	Postnaltag
PAM	Präameloblasten
(P)AM	(Prä-)Ameloblasten (nicht genau determinierbar, da fließender Übergang zwischen beiden Stadien)
Pcdh	Protocadherin
POD	Präodontoblasten
(P)OD	(Prä-)Odontoblasten (nicht genau determinierbar, da fließender Übergang zwischen beiden Stadien)
pSK	primärer Schmelzknoten

RT	Raumtemperatur
Shh	Sonic Hedgehog
SI	Stratum intermedium
SK	Schmelzknoten
SP	Schmelzpulpa
sSK	sekundärer Schmelzknoten
UK	Unterkiefer
v/v	Volumen ( <i>volume</i> ) pro Volumen ( <i>volume</i> )
vest.	vestibulär
w/v	Gewicht ( <i>weight</i> ) pro Volumen ( <i>volume</i> )
ZL	Zahnleiste
ZME	Zahnmesenchym
ZP	Zahnpapille
ZS	Zahnsäckchen

## 1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist, die Expression verschiedener Cadherine während der Odontogenese der Maus zu untersuchen und mögliche Funktionen abzuleiten. Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsionsmoleküle, die bei der Embryogenese, Organogenese und Tumorgenese eine Rolle spielen. Neben der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind sie unter anderem auch an Zelldifferenzierung, Zellaggregation, Zellpolarisation und an Signalwegen beteiligt. Da die Zahnentwicklung essentiell von solchen Zellprozessen bestimmt wird, lässt sich eine Beteiligung der Cadherine an der Odontogenese vermuten. Hierzu ist mittels *In-situ*-Hybridisierung die Expression von 7 verschiedenen (Proto-)Cadherinen (Cdh2, Cdh4, Cdh6, Cdh11, Pcdh7, Pcdh10 und Pcdh19) in 5 verschiedenen Stadien der Mausentwicklung (pränatal E12,5; E14,5; E16,5; postnatal P0 und P5) innerhalb der Zahnanlage untersucht worden.

Insgesamt sind die untersuchten Cadherine während der Zahnentwicklung ubiquitär vertreten. Sie sind in jedem untersuchten Stadium und in jeder Struktur der Zahnanlage exprimiert. Dabei ist zwischen den Cadherinen eine große Expressionsvarianz vorhanden. Jedes Cadherin hat eine individuelle Spezifität für bestimmte Strukturen und bestimmte Stadien. Dadurch ergibt sich ein für jedes Cadherin charakteristisches räumliches und zeitliches Expressionsmuster.

Durch die Analyse dieser spezifischen Expressionsmuster können mögliche Funktionen für die jeweiligen Cadherine abgeleitet werden. Diskutiert werden die Rolle bei der Differenzierung und Polarisierung der Ameloblasten (AM) und Odontoblasten (OD), die Steuerung reziproker Signalwege zwischen dem primären Schmelzknoten (pSK) und Zahnmesenchym (ZME) sowie der Einfluss auf die Zahnmorphologie und die Zelladhäsion für Stabilität und Abgrenzung verschiedener Gewebe. Dabei können viele bekannte Funktionen der Cadherine (Zelladhäsion, Zelldifferenzierung etc.) im Zuge der Zahnentwicklung in einen neuen Kontext gebracht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Cadherine eine wichtige Rolle während der Zahnentwicklung der Maus spielen. Das spatiotemporale Expressionsmuster weist auf einen Cadherin basierten, adhäsiven Code hin, der durch eine Vielzahl an Funktionen die Odontogenese entscheidend beeinflussen

kann. Die Cadherine können daher ein essentieller Faktor für die Prozesse sein, die die korrekte Ausbildung des Zahnes gewährleisten.

Zur Bestätigung der diskutierten Rolle der Cadherine sind aber noch weiterführende Experimente nötig. So können mittels transgener Mäuse nach Ausfall eines bestimmten Cadherins die Folgen auf die Zahnentwicklung untersucht werden. Die hier dargestellten Ergebnisse und zukünftige Forschungen sollen so zu einem tieferen Verständnis der Zahnentwicklung und der Cadherine beitragen.



## **2. Einleitung**

### **2.1 Vorwort**

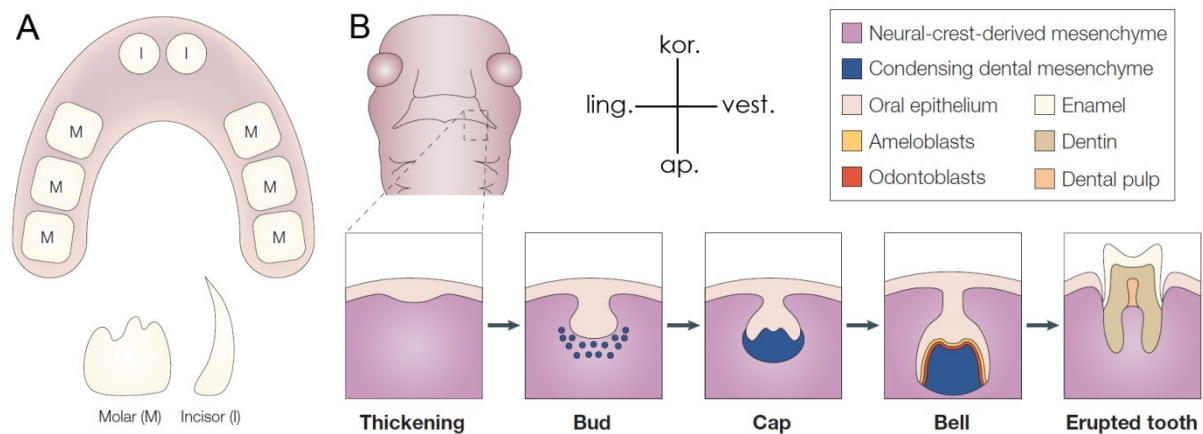
Die meisten Organe entstehen aus Epithel und Mesenchym. Die frühe Phase der Organogenese ist dabei bei vielen Organen ähnlich. Sie beginnt mit einer Verdickung des Epithels und einer Verdichtung des darunter liegenden Mesenchyms. Es folgen komplexe Teilungs-, Faltungs- und Differenzierungsprozesse, die zur spezifischen Ausbildung der jeweiligen Organe führen. Diese morphogenetischen Vorgänge sind seit langem bekannt (Thesleff et al. 1995). Doch erst mit den technischen Fortschritten in der Molekularbiologie und Gentechnik wurde es möglich, die Organogenese auch auf molekularer Ebene zu erforschen. Die so gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem umfangreichen Wissen über die Embryogenese bei und helfen so, auch pathologische Prozesse besser zu verstehen und zu behandeln. Auch die Zahnentwicklung ist ein Teil der Organogenese und wird molekularbiologisch intensiv erforscht. Zur Einführung in die Thematik wird nachfolgend eine Übersicht über die morphologischen Prozesse während der Odontogenese präsentiert.

### **2.2 Zahnentwicklung**

Die Maus (*Mus musculus*) hat nur eine Dentition. In jedem Quadranten bilden sich ein Inzisor (Schneidezahn) in der Front und drei Molaren (Backenzähne) in der Seite (Tucker und Sharpe 2004). Zwischen Inzisor und Molaren befindet sich ein Diastema (Abb.1 A). Dort entstehen embryonal Anlagen für weitere Zähne, die jedoch bereits pränatal apoptotisch werden (Keranen et al. 1999). Die Schneidezähne wachsen, wie bei Nagetieren üblich, zeitlebens nach.

Histogenetisch ist der Zahn sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Ursprungs. Das Epithel entstammt dem Epithel der Mundhöhle. Die Mesenchymzellen sind spezifische Zellen aus der Neuralleiste. Diese Zellen sind während der Embryogenese aus den dorsalen Anteilen des Neuralrohrs in die kranio-mandibuläre Region unter das Mundhöhlenepithel eingewandert (Chai et al. 2000). Sie sind daher neuroektodermalen Ursprungs (Mesektoderm). Epithel und Mesenchym führen im Zuge der Odontogenese eine komplexe Beziehung wechselseitiger Beeinflussung.

Die Interaktion zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen gilt bei den Vertebraten als wichtigster Mechanismus der Organentwicklung (Thesleff et al. 1995).



**Abbildung 1 (A)** Die Dentition der Maus. Jeder Quadrant hat einen Inzisor und drei Molaren. Zwischen Inzisor und Molaren ist ein Diastema. **(B)** Spatiotemporaler Überblick über die Odontogenese. Die Odontogenese wird in vier verschiedene Stadien eingeteilt: Das Leistenstadium (*Thickening*), das Knospenstadium (*Bud*), das Kappenstadium (*Cap*) und das Glockenstadium (*Bell*). Richtungskreuz in B (für Entwicklungsstadien in B; modifiziert nach Tucker und Sharpe 2004).

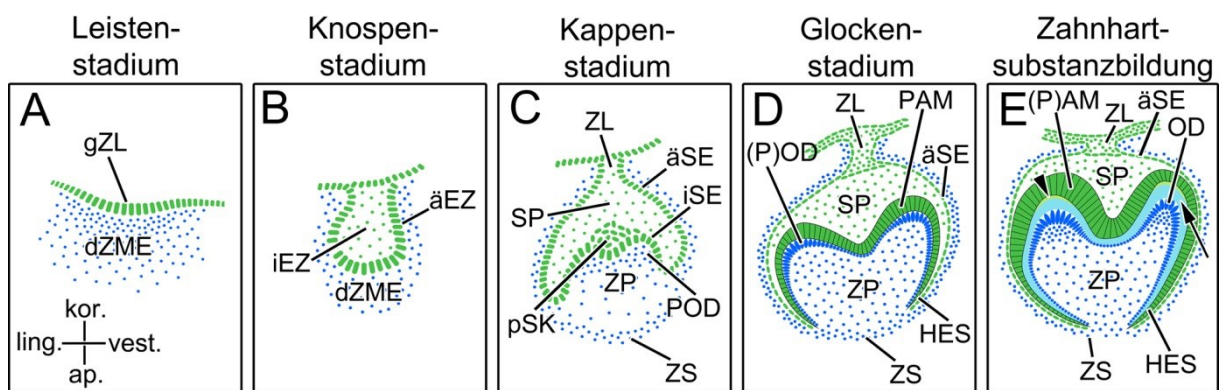
Bei den Säugetieren findet die Entwicklung der Zähne, konform zu ihrer späteren topographischen Lage, im singulären frontonasalen Fortsatz und in den paarig angelegten maxillären und mandibulären Fortsätzen statt. Embryologisch bilden sie die fünf Gesichtsfortsätze, die das *Stomatodeum* umgeben und bis auf den frontonasalen Fortsatz dem ersten Schlundbogen entstammen (Cobourne und Sharpe 2003).

Die Odontogenese wird zum besseren Verständnis in vier verschiedene Stadien eingeteilt: Das Leistenstadium, das Knospenstadium, das Kappenstadium und das Glockenstadium. Mit dem Glockenstadium beginnt die Bildung der Zahnhartsubstanzen, die den Zahn formen (Abb.1 B und Abb.2 A-E).

### 2.2.1 Leistenstadium

Bei der Maus ist der Beginn der Zahnentwicklung zwischen dem 10. und 12. Embryonaltag histologisch erkennbar und zeigt sich als Verdickung des oralen Epithels (Mitsiadis und Graf 2009, Tucker und Sharpe 2004). Diese Verdickung wird

generelle Zahnleiste (gZL) genannt (Abb.2 A). Jede Verdickung stellt die Anlage für einen Zahn dar. Diese Anlagen sind entlang des späteren Zahnbogens angeordnet. Zusätzlich wird durch jede Epithelverdickung der Zahn bildende Bereich lateral begrenzt (Jernvall und Thesleff 2012). Die Lage, die Anzahl und der Typ der sich bildenden Zahnanlagen werden bereits festgelegt, bevor die ersten Zeichen der Odontogenese histologisch sichtbar sind. Bei diesem Vorgang handelt es sich um einen komplexen Prozess epithelial-mesenchymaler Interaktion, der auf einem spezifischen Genexpressionsmuster mit den entsprechenden Signalkaskaden basiert (Tucker und Sharpe 2004).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Zahnentwicklung in verschiedenen Entwicklungsstadien (A-E). Grün kennzeichnet epitheliale Strukturen, blau mesenchymale Strukturen. Der Pfeil in E verweist auf (Prä-)Dentin. Die Pfeilspitze in E verweist auf Schmelz. Richtungskreuz in A (für A-E; Abbildung angefertigt mit freundlicher Unterstützung von J. Geiling).

### 2.2.2 Knospenstadium

Die Epithelzellen der gZL proliferieren und es entsteht eine Knospe, die in das darunterliegende determinierte Zahnmesenchym (dZME) ragt (Abb.2 B). Zeitlich findet dieser Prozess zwischen dem 12. und 14. Embryonaltag statt (Mitsiadis und Graf 2009, Tucker und Sharpe 2004). Histologisch sind im Epithel zwei verschiedene Zelltypen differenzierbar: elongierte Zellen, die an das dZME angrenzen (äußere Epithelzellen; äEZ), und rundliche Zellen im Inneren der Knospe (innere Epithelzellen; iEZ; Hu et al. 2005). Die aus der Neuralleiste eingewanderten Zellen im dZME kondensieren und beginnen, sich um die Knospe zu formieren (Chai et al. 2000). Dass auch hier die Spezifität der Genexpression, besonders die spatiotemporale Expression ihrer Produkte, eine maßgebliche Rolle spielt, zeigt das

Protein Activin $\beta$ A. Wurde dieses in Knockout-Mäusen ausgeschaltet, kam die Zahnentwicklung aller Inzisoren und Unterkiefermolaren mit dem Knospenstadium zum Erliegen. Die Oberkiefermolaren wurden jedoch unbeeinträchtigt ausgebildet (Ferguson et al. 1998).

Lateral der Knospe kommt es zu einer weiteren Verdickung des Epithels, der Vestibularleiste, die parallel zu dem Zahnbogen läuft. Sie gilt als Ursprung des oralen Vestibulums. Ihre Entstehung und ihr Verhältnis zur Zahnanlage werden jedoch kontrovers diskutiert (Hovorakova et al. 2005, Tonge 1969).

### 2.2.3 Kappenstadium

Das Epithel der Knospe bleibt morphologisch in den mundhöhlenepithelnahen Abschnitten im Wachstum zurück, während die mundhöhlenepithelfernen Abschnitte nach apikal und lingual/vestibulär proliferieren. Das dZME wird kappenartig vom Epithel umschlossen (Jernvall und Thesleff 2000). Dieser Vorgang findet zwischen dem 14. und 15. Embryonaltag statt (Mitsiadis und Graf 2009, Tucker und Sharpe 2004). Das umschlossene dZME wird zur Zahnpapille (ZP) und stellt den Vorgänger der Odontoblasten (Dentin bildende Zellen; OD) sowie der Pulpa dar (Abb.2 C). Die peripheren Anteile des dZME ordnen sich um die Zahnanlage an und bilden das Zahnsäckchen (ZS), aus dem der Zahnhalteapparat hervorgeht (Thesleff et al. 2001). Histologisch sind im Kappenstadium vier verschiedene Zelltypen unterscheidbar: 1) Das äußere Schmelzepithel (äSE), das über die Zahnleiste (ZL) Kontakt mit dem Mundhöhlenepithel hat; 2) das innere Schmelzepithel (iSE), das an die ZP angrenzt und den Vorgänger der Ameloblasten (Schmelz bildende Zellen; Syn. Adamantoblasten; AM) darstellt; 3) die Schmelzpulpa (Syn. *Stratum reticulare*; SP), die als aufgelockerte Zellschicht zwischen beiden Epithelschichten liegt, und 4) der primäre Schmelzknoten (pSK), der sich als kondensierte Zellansammlung innerhalb des iSE befindet (Abb.2 C). Zusammen bilden sie das Schmelzorgan (Lesot und Brook 2009). Die Grenze zwischen Epithel und Mesenchym ist durch eine Basalmembran (Syn. *Membrana preformativa*) dargestellt (Lesot und Brook 2009). Der pSK besteht aus mitotisch inaktiven Zellen und ist von den angrenzenden Zellen des iSE differenzierbar. Er bestimmt Lage, Form und Anzahl der Höcker und ist daher für die Zahnform verantwortlich (Jernvall et al. 1994). Hierzu exprimiert er mindestens 10 verschiedene Signalmoleküle, die die dazu nötigen histo- und

morphologischen Veränderungen umsetzen. Sie gehören beispielsweise der Hedgehog- und Wnt-Familie an. Das dazu spezifische Genexpressionsmuster im pSK lässt sich bereits nachweisen, bevor im Epithel die entsprechenden Zellveränderungen sichtbar sind (Jernvall und Thesleff 2000). Mit der Ausbildung des pSK steht die Zahnmorphologie irreversibel fest (Jernvall et al. 1994).

#### **2.2.4 Glockenstadium**

Durch die mitotische Inaktivität des pSK und der hohen mitotischen Aktivität der Zellen des iSE wird der morphologische Faltungsprozess, der bereits zur Zahnkappe geführt hat, fortgesetzt. Das Epithel wächst weiter in das Mesenchym hinein und umfasst die ZP großflächiger. Das histologische Korrelat ist die Glockenform (Abb.2 D), ein Prozess, der sich zwischen dem 16. und 19. Embryonaltag abspielt (Mitsiadis und Graf 2009, Tucker und Sharpe 2004). Der apikale Bereich des Schmelzorgans, der Kontaktpunkt von äSE und iSE, ist die Hertwig-Epithelscheide (HES; Abb.2 D). Sie ist an der Ausbildung der Zahnwurzel beteiligt (s.2.2.6, S.10). Die Zellen des pSK werden apoptotisch. Bei einhöckerigen Zähnen (Inzisoren) bleiben an der Position der späteren Höckerspitze Zellen des pSK übrig. Bei mehrhöckerigen Zähnen (Molaren) bilden sich sekundäre Schmelzknoten (sSK) aus, deren Lage mit den Positionen der späteren Höcker korrespondiert (Thesleff et al. 2001). Auch die sSK sind Zellverdichtungen innerhalb des iSE und bestehen aus nichtproliferierenden Zellen (Jernvall und Thesleff 2000). Histologisch ist zwischen dem iSE und dem sSK jedoch sehr schwer zu differenzieren. Die Herkunft dieser Zellen ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass sie aus Zellen des pSK, die keine Apoptose vollzogen haben, stammen (Jernvall und Thesleff 2012). Die Verteilung der Zellen des pSK an die Zellen des sSK erfolgt aber ungleichmäßig. So sorgt der pSK für ein asymmetrisches Wachstum innerhalb des iSE und ermöglicht die nichtsymmetrische Form der Molaren (Obara und Lesot 2007). Das iSE induziert nun die Differenzierung von Mesenchymzellen der ZP zu Präodontoblasten (POD) und weiter zu sekretorischen OD (Ruch et al. 1995). Die Induktion beginnt z.T. bereits im Kappenstadium. Für diesen Prozess ist die Basalmembran wichtig, da sie die nötigen Signale (z.B. Wachstumsfaktor TGF $\beta$ ) dieser epithelial-mesenchymalen Interaktion vermittelt (Lesot et al. 2001). Dafür ist die strukturelle Zusammensetzung der Membran von Bedeutung. So kommt es bei der OD-Differenzierung zu einer

Verdickung der Membran mit einer Anreicherung von TGF $\beta$ -Bindungsproteinen. Diese Zelldifferenzierung betrifft nur die Zellen der ZP, die direkt an die Basalmembran angrenzen. Die Differenzierung startet in der unmittelbaren Nähe der sSK, wodurch die korrekte Lage der Höcker realisiert wird (Thesleff et al. 2001).

Parallel dazu beginnen sich die Zellen des iSE zu Präameloblasten (PAM) zu differenzieren. Das zelluläre Schicksal dieser Epithelzellen wird bereits im Knospenstadium bestimmt. Hintergrund ist die Interaktion zwischen Vorläuferzellen des iSE und dem angrenzenden dZME (Zeichner-David et al. 1995).

Dem iSE/den PAM anliegend, entsteht als neue Struktur in der SP das *Stratum intermedium* (SI). Es ist eine zwei- bis dreilagige, dichte Zellschicht, die nun das iSE von der übrigen SP trennt. Ursprung, Entwicklung und Funktion sind noch nicht ausreichend geklärt (Koyama et al. 2001, Gomez und Boyde 1994).

Mit dem Glockenstadium wachsen die ersten Blutgefäße in die ZP ein, die den Zahn versorgen (Nait Lechguer et al. 2008). Die Einwanderung der Nerven in die ZP findet jedoch erst mit Ausbildung der Zahnkrone statt (Mohamed und Atkinson 1983).

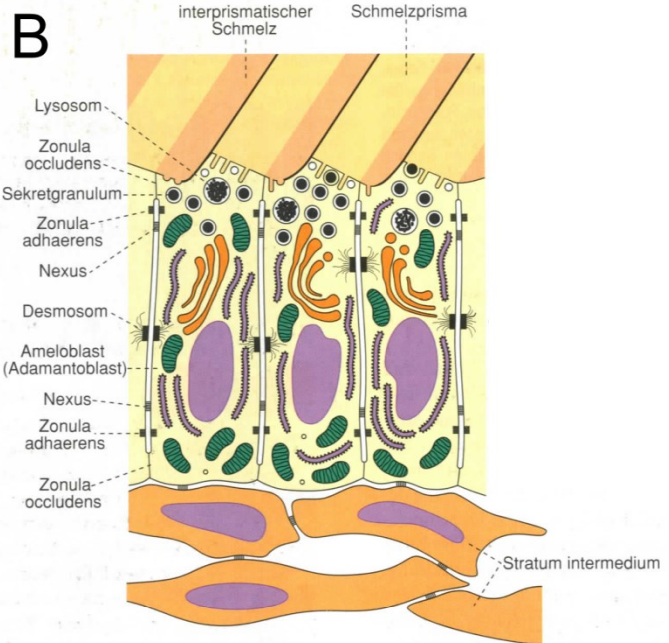
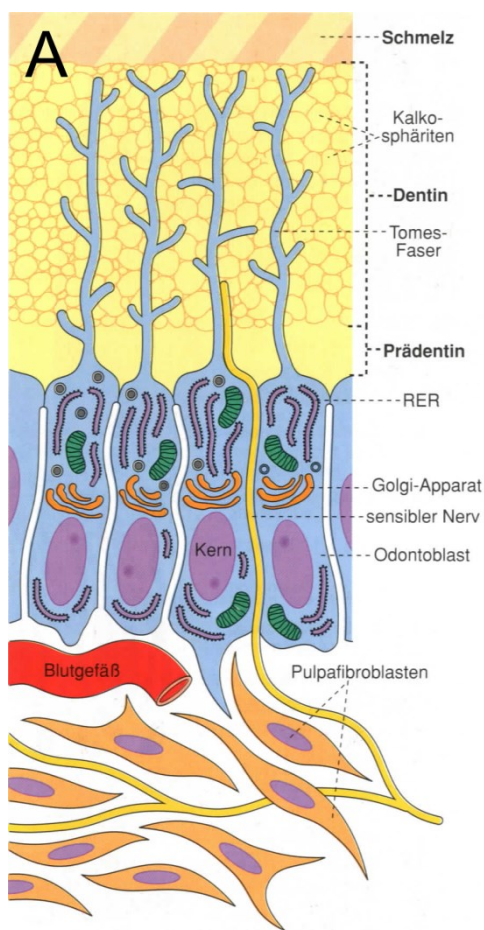
## **2.2.5 Bildung der Zahnhartsubstanzen**

### *Dentinbildung*

Mit dem späten Glockenstadium (zwischen dem 18. und 20. Embryonaltag) sind die ersten OD ausdifferenziert und beginnen mit der Sekretion von Prädentin (Pfeil, Abb.2 E; Ruch et al. 1995, Mitsiadis und Graf 2009). Prädentin ist eine Mischung aus kollagener Matrix und nichtkollagenen Proteinen (Butler und Ritchie 1995). Mit der vermehrten Freisetzung von weiterem Prädentin beginnen die vorher gebildeten Prädentinbereiche zu mineralisieren, indem sich um die Kollagenfasern Kristalle aus Hydroxylapatit bilden. So entsteht das fertige Dentin. Auch wenn dieser Vorgang noch nicht endgültig verstanden wird, ist nachgewiesen, dass die nichtkollagenen Proteine hierbei eine entscheidende Rolle spielen (Butler und Ritchie 1995). Die Bildung des Prädentins unterliegt einem zirkadianen Rhythmus und zeigt sich histologisch an den Ebner'schen Linien (Zheng et al. 2014). Während die Synthese des Prädentins im Zellkörper stattfindet, erfolgt dessen Sekretion über einen Zellfortsatz. Er besteht aus einem Hauptast, von dem mehrere Seitenäste abgehen. Diese Struktur verbleibt im Dentin und verlängert sich, je mehr Dentin sezerniert wird

(Linde und Goldberg 1993). Sie wird Tomes-Faser genannt (Abb.3 A). Die Tomes-Faser stellt eine immerwährende Verbindung der OD zum Dentin dar.

Die OD entfernen sich von der Schmelz-Dentin-Grenze und bilden den Übergang vom Dentin zur späteren Zahnpulpa. Im Gegensatz zu den AM bleiben die OD erhalten und bilden zeitlebens Dentin (Sekundärdentin) nach. Sie sind sogar in der Lage, auf pathologische Reize, wie Karies, zusätzliches Dentin (Tertiärdentin) zu bilden, das die Pulpa schützt (Bleicher 2014).



**Abbildung 3 (A)** Schematische Darstellung der OD. Die OD sezernieren das Prädentin über den Tomes-Fortsatz. Dieser verlängert sich und verbleibt im Dentin. RER: raues endoplasmatisches Retikulum. **(B)** Schematische Darstellung der AM. Die AM-Differenzierung geht mit komplexen intrazellulären Veränderungen einher, wie zum Beispiel der basalen Anordnung von Mitochondrien und Zellkernen (modifiziert nach Welsch 2003).

### Schmelzbildung

Die Bildung des Dentins durch die OD induziert gleichzeitig die Differenzierung von PAM zu präsekreterischen AM, die sich anschließend zu sekretorischen AM differenzieren (He et al. 2010). Dieser Prozess geht mit komplexen (intra-)zellulären Veränderungen der (P)AM einher, wie zum Beispiel der Anordnung von Mitochondrien und Zellkernen nach basal (ZP-fern; Abb.3 B; Lesot und Brook 2009).



Die ausdifferenzierten AM beginnen nun mit der Sekretion des Zahnschmelzes (Pfeilspitze, Abb.2 E). Die Schmelzbildung geschieht in zwei Phasen, der sekretorischen Phase und der Reifephase. In der sekretorischen Phase wird die proteinreiche, organische Matrix als Schmelzgrundsubstanz freigesetzt. Dieses geschieht über die apikalen (ZP-nahen) Tomes-Fortsätze (He et al. 2010). Die Sekretion der Schmelzgrundsubstanz unterliegt dabei einem zirkadianen Rhythmus, der sich in Phasen vermehrter bzw. verminderter Schmelzproduktion äußert. Dadurch resultieren histologisch sichtbare Streifen im späteren Schmelz (Retzius-Streifen; Zheng et al. 2014). Unmittelbar nach der Sekretion bilden sich in der Schmelzgrundsubstanz Schmelzkristalle aus Hydroxylapatit, die zu Schmelzprismen auskristallisieren. In dieser initialen Phase der Schmelzbildung wird zunächst nur grob die Form, Ausrichtung und Position der Schmelzprismen festgelegt (Smith 1998). Eine entscheidende Rolle bei der Topographie und Morphologie dieser Prismen spielen sezernierte Schmelzproteine, wie zum Beispiel Amelogenin oder Enamelin. Deren genaue Funktionsweise wird aber noch untersucht (Hu et al. 2007). Mit zunehmender Schmelzdicke entfernen sich die AM immer weiter von der Schmelz-Dentin-Grenze. Ist die endgültige Dicke der Schmelzschicht erreicht, beginnt die Reifephase. Dabei verändern die AM ihre Morphologie, indem sich unter anderem der Tomes-Fortsatz zurückbildet. Parallel kommt es zu einer prozentualen Abnahme der organischen Matrix, inklusive der Schmelzproteine und des Wassergehaltes (Zeichner-David et al. 1995). Diese Veränderungen führen dazu, dass die Schmelzprismen stark an Größe und Volumen zunehmen, indem neue Hydroxylapatitkristalle gebildet werden. Diese expandieren in den nun freien Raum und bilden damit den mineralisierten, harten Schmelz. Die nun funktionslosen, reduzierten AM verbleiben als Schutzschicht auf dem fertigen Schmelz (Smith 1998).

#### **2.2.6 Bildung der Zahnwurzel**

Zeitlich startet die Wurzelbildung gegen Ende der Kronenbildung. Maßgeblich daran beteiligt ist die HES. Sie ist epithelialen Ursprungs. Von dort ausgehend wird durch epithelial-mesenchymale Interaktionen die Differenzierung der OD initiiert, die anschließend das Wurzeldentin bilden (Linde und Goldberg 1993). Die Details dieses Prozesses sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt (Zeichner-David et al. 2003). Unter anderem wurde aber nachgewiesen, dass einzelne Zellen der HES eine



epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu Zementoblasten vollziehen (s.2.2.7, S.11). Die HES bildet sich größtenteils wieder zurück, die verbleibenden Zellreste werden Malassez'sche Epithelreste genannt (Akimoto et al. 2011).

### **2.2.7 Bildung des Zahnhalteapparats**

Der Zahnhalteapparat entstammt dem ZS. Dessen mesenchymale Zellen differenzieren sich zu 3 verschiedenen Zelltypen: Zementoblasten, Fibroblasten und Osteoblasten. Die Zementoblasten bilden das Zement, das das Wurzeldentin schützend bedeckt und die Sharpey'schen Fasern aufnimmt. Diese Fasern, die den Zahn im Knochenfach aufhängen, werden von den Fibroblasten sezerniert und bestehen aus Kollagen. Die Osteoblasten beteiligen sich an der Knochenbildung der Alveole und nehmen das andere Ende der Sharpey'schen Fasern auf. Auch hier spielt die HES eine wichtige Rolle. Sie wird als Ursprungsort bestimmter Zementoblasten diskutiert und ihre Derivate, die Malassez'sche Epithelreste, gelten als wichtige Quelle von Stammzellen für die Regeneration des Zahnhalteapparats (Ten Cate 1997, Xiong et al. 2013).

### **2.2.8 Zahndurchbruch**

Lange wurde die Wurzelausbildung für den entscheidenden Faktor des Zahndurchbruches gehalten. Experimente zeigen aber, dass auch wurzellose Zähne in die Mundhöhle durchbrechen können (Cahill und Marks 1982). Eine vorherige Entfernung des ZS verhindert dieses jedoch (Larson et al. 1994). Da wurzellose Zähne keine Sharpey'sche Fasern und keine Zementschicht haben, aber dennoch das ZS eine entscheidende Rolle beim Zahndurchbruch spielt, bleibt nur noch der Alveolarknochen als entscheidender Faktor. So wird vermutet, dass dort komplexe Resorptions- und Umbauprozesse zum Zahndurchbruch führen (Wang 2013).

## **2.3 Cadherin-Superfamilie**

Es wurde verdeutlicht, dass die Entwicklung der Zähne ein komplexer Prozess morphologischer und histologischer Veränderung ist. Sie beinhaltet Vorgänge wie Zelldifferenzierung, Zellsortierung und Zellpolarisierung (s.2.2, S.3). Die Cadherine



Cadherine wurden erstmals als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsionsmoleküle in Teratokarzinomen (maligne Keimzelltumoren) entdeckt (Yoshida und Takeichi 1982). Die notwendige Anwesenheit von Calcium zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten führte zu dem Namen *Cadherin* als Abkürzung der englischen Bezeichnung *calcium adhering*. Heute stellen die Cadherine eine Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle mit mindestens 6 Unterfamilien dar. Sie setzt sich aus den klassischen Typ-I-Cadherinen, den atypischen Typ-II-Cadherinen, den Desmocollinen, den Desmogleinen, den Protocadherinen (Pcdh) und den Flamingocadherinen zusammen (Abb.4; Nollet et al. 2000). Sie kommen in *adhaerens junctions*, Desmosomen, myokardialen Glanzstreifen und Synapsen vor und vermitteln so die Adhäsion zwischen zwei Zellen (Wheelock und Johnson 2003b). Darüber hinaus sind sie an Signalwegen beteiligt, die wichtige Prozesse der Embryogenese, wie Zellteilung und Zelldifferenzierung, kontrollieren (Stepniak et al. 2009).

Aufgrund dieser Aufgaben spielen sie bei der Entwicklung der Vertebraten eine essentielle Rolle und lassen sich dort in fast allen Geweben finden (Halbleib und Nelson 2006). Das breite Vorkommen der Cadherine hat zur Folge, dass ihre Rolle in vielen Bereichen der Embryogenese und Organogenese intensiv erforscht wird. Eines der größten Forschungsgebiete stellt die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems dar (Takeichi 2007, Hirano et al. 2003).

Um zu verstehen, inwiefern das breite Spektrum der Cadherine auch an der Odontogenese beteiligt sein könnte, ist es sinnvoll, diese auch hinsichtlich Aufbau und Funktion näher zu betrachten.

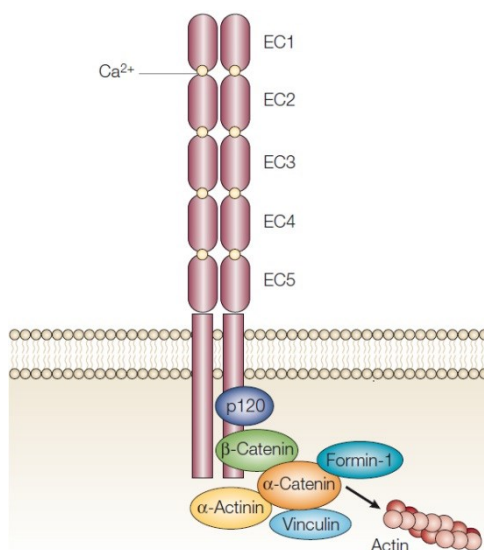
### **2.3.1 Aufbau**

Cadherine sind transmembranäre Glykoproteine, bestehend aus einer extrazellulären und intrazellulären Domäne. Gemeinsames Merkmal aller Unterfamilien ist der extrazelluläre Teil, der sich aus "extrazellulären Cadherin-Domänen" (ECs) zusammensetzt. Jede EC besteht aus einer Sequenz von ca. 110 Aminosäuren. Man unterscheidet vier homologe Domänen (EC1-4) sowie eine strukturell andersartige, membrannähe Domäne (EC5). Die Domänen EC1 bis EC4 wiederholen sich unterschiedlich oft. Die Anzahl der Cadherin-Domänen (EC5 ausgenommen) variiert so von 4 ECs (klassische Cadherine) bis 34 ECs (Flamingo-Cadherine; Nollet et al.

2000). Da in dieser Arbeit klassische Cadherine und Protocadherine untersucht werden, wird bei dem Aufbau nur auf diese beiden Unterfamilien näher eingegangen.

### Klassische Typ-I Cadherine

Die extrazelluläre Domäne der klassischen Cadherine besteht aus 5 ECs (Abb.5). EC1 enthält das hoch konservierte HAV-Motiv (Histidin-Alanin-Valin). Ob dieses, wie bisher angenommen, für den Bindungsmechanismus entscheidend ist, ist umstritten (Renaud-Young und Gallin 2002). An EC5 schließt sich eine *singlepass*-Transmembrandomäne an. Intrazellulär folgt eine zytoplasmatische Domäne, die zytoplasmatische Signalproteine (Signaltransduktion) sowie zytoskelettale Proteine (Zelladhäsion) bindet (Leckband und de Rooij 2014). Bei der mechanischen Kopplung zwischen Cadherin und Zytoskelett spielen die Catenine (eine Gruppe von zytosolischen Proteinen) eine entscheidene Rolle, indem sie hier als verbindendes Strukturprotein fungieren (Abb.5).



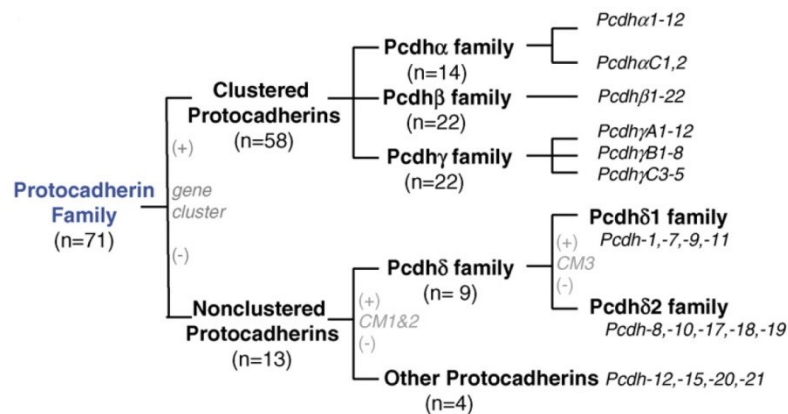
**Abbildung 5** Schematische Darstellung der klassischen Cadherine. Die klassischen Cadherine bestehen aus 5 ECs, die über eine *singlepass*-Transmembrandomäne mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden sind. Intrazellulär erfolgt die Kopplung an zytoplasmatische Signalproteine (Signaltransduktion) und zytoskelettale Proteine (Zelladhäsion; modifiziert nach Gumbiner 2005).

### Protocadherine

Die extrazelluläre Domäne der Protocadherine besteht aus 6 bis 7 ECs. Auch die Protocadherine haben eine *singlepass*-Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Die Protocadherine lassen sich in zwei Untergruppen einteilen (Abb.6): Die geclusterten Protocadherine und die nichtgeclusterten Protocadherine. Die geclusterten Protocadherine unterteilen sich in α-, β- und γ-

Protocadherine, die jeweils an einem kleinen Gen-Locus gebündelt liegen. Bei den nichtgeclusterten Protocadherinen ist die Gruppe der  $\delta$ -Protocadherine zu nennen, die sich in  $Pcdh\delta_1$  und  $Pcdh\delta_2$  unterteilen lässt (Redies et al. 2005). Allen  $\delta$ -Protocadherinen ist gemeinsam, dass sie in ihrer zytoplasmatischen Domäne hochkonservierte Motive enthalten (Vanhalst et al. 2005).

Die Details der intrazellulären Bindung und Funktion der Protocadherine sind gegenwärtig noch Bestandteil der Forschung (Halbleib und Nelson 2006). Eine Komplexbildung von  $Pcdh\alpha$  und  $Pcdh\gamma$  mit der Rezeptor-Tyrosinkinase (Ret) reguliert beispielsweise die Tyrosin-Phosphorylierung. Dieses weist auf eine Involvierung der Protocadherine in entsprechende Signalkaskaden hin (Schalm et al. 2010).



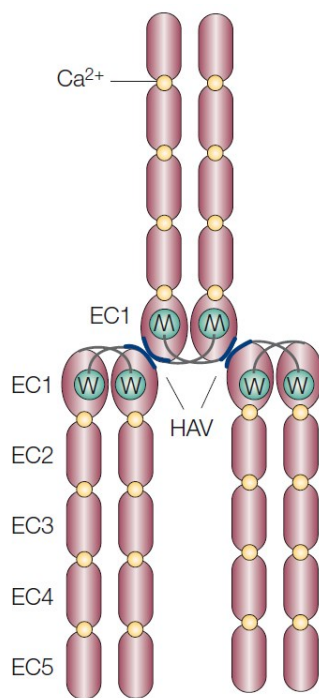
**Abbildung 6** Die Klassifizierung der Protocadherine. Die Protocadherine lassen sich in geclusterte und nichtgeclusterte Protocadherine einteilen. Die geclusterten Protocadherine unterteilen sich in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Protocadherine. Die nichtgeclusterten  $\delta$ -Protocadherine sind in  $Pcdh\delta_1$  und  $Pcdh\delta_2$  differenzierbar (modifiziert nach Morishita und Yagi 2007).

### 2.3.2 Mechanismus der Adhäsion

Der hier beschriebene adhäsive Wirkmechanismus bezieht sich auf die klassischen Cadherine, da diese die am besten erforschte und verstandene Gruppe der Cadherine darstellen.

Zunächst bilden zwei Cadherine auf derselben Zelloberfläche ein *cis*-Dimer. Diese Konformation ermöglicht die Bindung mit dem Cadherin-Dimer einer anderen Zelle mittels einer *trans*-Dimer-Bindung über die EC1-Domänen (Abb.7; Leckband und Prakasam 2006). Verschiedene Studien machen die Komplexität dieser Bindungsprozesse deutlich, die verschiedene Bindungsmodelle, wie beispielsweise X-Dimere, hervorbringen (Harrison et al. 2010, Rakshit et al. 2012). Voraussetzung

ist aber die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  an ihren Bindungsstellen zwischen den ECs. Es sorgt für den Strukturhalt der extrazellulären Domäne und ist somit essentiell für die Adhäsion (Perez und Nelson 2004, Pokutta et al. 1994). Forschungen klassifizieren diese Adhäsion als vornehmlich homophile Bindung, bei der nur Cadherine des gleichen Subtyps eine Bindung eingehen (Takeichi 1991). Weitere Untersuchungen zeigen aber auch heterophile Interaktionen (Shimoyama et al. 2000).



**Abbildung 7** Schematische Darstellung des Bindungsmechanismus klassischer Cadherine. Zwei Cadherine derselben Zelle bilden ein *cis*-Dimer. Dieses Dimer geht mit dem Cadherin-Dimer einer anderen Zelle über die EC1-Domänen eine *trans*-Dimer-Bindung ein. Voraussetzung für die Bindung ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (modifiziert nach Gumbiner 2005).

### 2.3.3 Funktion

Die Funktion der Cadherine geht weit über die eines reinen Zelladhäsionsmoleküls hinaus. Im Folgenden werden einige wichtige Funktionen kurz skizziert.

#### Zelladhäsion

Wie bereits beschrieben, vermitteln die Cadherine Zell-Zell-Kontakte. Da einzelne Cadherin-Bindungen nur sehr schwach sind, kommt es zu lokalen Ansammlungen (*cluster*) von Cadherin-Bindungen. Die Zell-Zell-Verbindung wird so um ein Vielfaches stabiler (Niessen et al. 2011). Der Entstehungsmechanismus der *cluster* ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Eine Schlüsselrolle scheint dabei das

Zytoskelett zu spielen, indem F-Actin die Clusterbildung und -stabilität unterstützt (Hong et al. 2013). Zell-Zell-Kontakte wie diese sind die Grundvoraussetzung dafür, dass aus einzelnen Zellen und Geweben dreidimensionale Strukturen entstehen können (Nelson et al. 2013). Die Adhäsion bestimmter Zellgruppen ist ebenfalls durch die Kompartimentierung möglich. So kommt es beispielsweise während der frühen Embryogenese im (Cdh1 exprimierenden) Ektoderm, lokal im Bereich der Neuralplatte, zu einem *switch* von Cdh1 zu Cdh2. Das ermöglicht die Ausbildung des Neuralrohrs (Taneyhill 2008).

### Zellsortierung/Zellaggregation

Die Cadherine spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellsortierung. In einer Ansammlung von L-Zellen (neuroendokrine Zellen des Darms), die entweder E- oder P-Cdh exprimieren, kommt es zur Aggregation derjenigen Zellen, die das gleiche Cadherin exprimieren (Nose et al. 1988). Dieser Prozess ist auch ein wichtiger Faktor bei der EMT im Zuge der Migration von Neuralleistenzellen. Die EMT geht mit komplexen intrazellulären Veränderungen einher und beinhaltet die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte. So kommt es bei der Expression der betroffenen Zellen zu einem *switch* von hochadhäsiven Typ-I-Cadherinen zu wenig adhäsiven Typ-II-Cadherinen (Sauka-Spengler und Bronner-Fraser 2008). Eine entscheidende Rolle bei der Zellaggregation spielt auch das Zytoskelett, ohne dessen Integrität sich kein Zell-Zell-Kontakt ausbilden kann (Jaffe et al. 1990).

### Zelldifferenzierung

Die Expression eines Cadherins in einer undifferenzierten Zelle hat entscheidenden Einfluss auf deren histogenetisches Schicksal. So führt die Transfektion von Stammzellen mit cDNA für Cdh1 zu einer Differenzierung zu Epithelzellen (Larue et al. 1996). Die Cadherine scheinen daher über einen intrazellulären Signalweg die spezifische Differenzierung unterschiedlicher Gewebe zu kontrollieren. Die genauen Vorgänge werden noch untersucht.

### Zellpolarisation

Die durch Cdh1 vermittelte Zelladhäsion teilt die Zelle in eine apikale und basale (Syn. basolaterale) Domäne. Durch diese Unterteilung werden in den jeweiligen Domänen spezifische Proteinkomplexe gebildet (Baum und Georgiou 2011). Es gibt einen apikalen und einen basolateralen Proteinkomplex. Diese beiden Komplexe wirken gegenseitig antagonistisch und sorgen so für die Aufrechterhaltung der Polarität (Nelson et al. 2013). Beispielsweise sorgen diese Polaritätsproteine in Zusammenarbeit mit Rho-GTPasen (s.Signalwege, S.18) für die Ausbildung basaler Filopodien (fadenförmige Ausstülpungen der Zelle) durch das Zytoskelett, die zur Polarität beitragen (Georgiou und Baum 2010). Viele Details der Zellpolarisierung sind aber noch unbekannt.

### Signalwege

Für die Umsetzung der bisher genannten Funktionen ist eine Verbindung zwischen Cadherin-Expression und intrazellulären Veränderungen essentiell. Cadherine verfügen über Mechanismen, mit denen bestimmte Signale in das Zellinnere geleitet werden (*signaling*). Diese Mechanismen funktionieren direkt oder indirekt.

#### *Indirektes signaling*

Der durch die Cadherine geschaffene enge Kontakt zwischen zwei Zellen ermöglicht es membran-assoziierten Liganden einer Zellmembran, mit Rezeptoren der gegenüberliegenden Membran zu interagieren. So können Signale von Zelle zu Zelle geleitet werden (Vleminckx und Kemler 1999). Dieser Mechanismus heißt juxtakrines *signaling* und stellt eine der wichtigsten Grundlagen kontaktabhängiger Signalwege dar. So sind in Geweben, wie dem Myokard, Cadherine nötig, um *gap junctions* ausbilden zu können (Fagotto und Gumbiner 1996). Des Weiteren fand die Gruppe um Byers et al. (1992) heraus, dass Cadherine selbst als Ligand fungieren können. Sie entdeckte, dass die extrazelluläre Domäne des Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1) eine Sequenz enthält, die homolog zur HAV-Sequenz von Cdh2 ist, was die gegenseitige Bindung ermöglicht.



*Direktes signaling*

Auch wenn eine Vielfalt an Prozessen aufgedeckt wurde, bei denen Cadherine die Signalwege der Zelle beeinflussen und regulieren (Stepniak et al. 2009), gibt es vier hervorzuhebende Bereiche: Die Wnt-Signalkaskade, der Hedgehog-Signalweg, die Rho-GTPase und die Rezeptor-Tyrosinkinase.

Der Cadherin-Catenin-Komplex dient nicht nur der mechanischen Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten. Im Wnt-Signalweg (essentieller Signaltransduktionsweg bei der Embryogenese) spielen beispielsweise  $\beta$ -Catenine (Abb.5) eine zentrale Rolle. Normalerweise gelangt freies  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und fungiert dort als transkriptioneller Kofaktor. Es wird aber durch die Wnt-Signalkaskade in seiner Funktion gehemmt.  $\beta$ -Catenin, das jedoch durch ein Cadherin fest gebunden wird, kann nicht mehr durch Wnt-Signale reguliert werden (Clevers 2006). Der Cadherin-Zellkontakt wirkt so auf diesen Signalweg regulierend (Fagotto et al. 1996).

Auch über  $\alpha$ -Catenin (Abb.5) gibt es eine Verbindung zu Signalkaskaden.  $\alpha$ -Catenin aktiviert den Hedgehog-Signalweg, einen der wichtigsten Signalwege der frühen Embryogenese. Folgen sind ein verminderter Zellzyklus und kortikale Hyperplasie (Lien et al. 2006). Wie genau diese Aktivierung durch  $\alpha$ -Catenin geschieht, ist unbekannt.

P120, ein weiteres Mitglied der Catenin-Familie, bindet ebenfalls an membrangebundene Cadherine (Abb.5). Im Zytosol pendelt es zwischen Cadherin und der Rho-GTPase RhoA, die es inaktiviert. RhoA, die an der dynamischen Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, wird so in ihrer Funktion reguliert.

Weiterhin gibt es eine Verbindung zwischen Cadherinen und der Rezeptor-Tyrosinkinase, einem membrangebundenen Rezeptor, der u.a. mit Wachstumsfaktoren interagiert. Beispielsweise kann Cdh2 den FGFR dimerisieren und damit ohne FGF ein Signal initiieren. So konnte ohne die Anwesenheit des Wachstumsfaktors ein Auswachsen von Neuriten induziert werden (Wheelock und Johnson 2003a).

### **3. Ziele der Arbeit**

Es ist deutlich geworden, dass die Cadherine in vielen Bereichen der Embryogenese erforscht und viele dieser Prozesse mittlerweile gut verstanden werden. Es gibt ein breitgefächertes Wissen darüber, in welchen Teilen der Embryogenese Cadherine beteiligt sind, welche molekularen Mechanismen dahinterstecken und wie diese Mechanismen funktionieren.

Bei der Odontogenese sind in dieser Hinsicht noch viele Fragen ungeklärt. Wie bereits dargestellt, beschränkt sich die Untersuchung der Cadherine während der Odontogenese hauptsächlich auf Cdh1 (E-Cdh) und Cdh2 (N-Cdh). Die Expression vieler weiterer Cadherine war auf diesem Gebiet bisher kaum Gegenstand der Forschung. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, die spatiotemporalen Expressionsmuster weiterer Cadherine bei der Zahnentwicklung zu untersuchen, um die Hypothese einer breiten Beteiligung zu untermauern. Dabei ist es essentiell, sowohl alle beteiligten Gewebe als auch entsprechend repräsentative Stadien der Odontogenese zu analysieren. Aus diesen Ergebnissen sollen einige Funktionen der Cadherine abgeleitet werden, die sie im Zuge der Odontogenese erfüllen. Es ist festzuhalten, dass es sich bei diesen Funktionen um Hypothesen handelt, deren Verifizierung weiterführende, zukünftige Experimente benötigt.

Zusammenfassend soll diese Arbeit also einen umfassenden Überblick über die spatiotemporale Expression der Cadherine während der Zahnentwicklung und ihren Einfluss auf die dort stattfindenden Prozesse geben. Dabei sollen bereits bekannte Fakten ergänzt sowie neue, bisher unbekannte Ergebnisse präsentiert werden. So kann zum einen der Kenntnisstand auf dem Gebiet der Odontogenese und Cadherine erweitert werden, und zum anderen durch Ansätze für weiterführende Untersuchungen deren zukünftige Erforschung gefördert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Standard-Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma Aldrich bezogen und werden nicht extra aufgeführt. Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit.

Anillinblau	Merck KGaA, Darmstadt
Anilinöl	BASF, Ludwigshafen am Rhein
Azokarmin G	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) Blocking-Reagenz	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot Roche GmbH, Mannheim
Denhardt's-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dextransulfat (50%)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Fast Red Tabletten	Roche GmbH, Mannheim
Formamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hoechst 34580	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
Mowiol 4-88	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, USA

Natriumazid (10%)	Merck KGaA, Darmstadt
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot
Orange-G	Hollborn & Söhne, Leipzig
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorwolframsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tissue Tek O.C.T.	Science Services GmbH, München
Triethanolamin	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

#### **4.1.2 Nukleinsäuren und Enzyme**

##### Nukleinsäuren

Hefe t-RNA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Lachs-DNA, aus Lachshoden, einzelsträngig	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

##### Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

#### **4.1.3 Antikörper und andere Proteine**

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente, polyklonal	Roche GmbH, Mannheim
Anti-Fluorescein-AP, Fab-Fragmente, polyklonal	Roche GmbH, Mannheim

Schafserum, normal  
Schafserum, hitzeinaktiviert

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim  
Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

#### 4.1.4 Plasmide

Die folgenden Plasmide dienen zur Herstellung der Digoxigenin/Fluorescein-markierten *sense*- und *antisense*-RNA-Sonden:

**Tabelle 1** Plasmide (modifiziert aus Hertel und Redies 2011)

Gen	Name des Plasmids	Sondenlänge (bp)	Gen-Bank Zugangsnummer	Literatur
Cdh2 (N-Cdh)	bMN3sk+	2739	NM0010011615.1	(Miyatani et al. 1989)
Cdh4 (R-Cdh)	pBSMR4	2739	D14888	(Matsunami et al. 1993)
Cdh6	pBSII1.0B-mCdh6	1027	D82029	(Inoue et al. 1997)
Cdh11	BSSK11	2388	D31963	(Kimura et al. 1995)
Pcdh7	pGEMte-mPcdh7	1628	NM018764	(Vanhalst et al. 2005)
Pcdh10 (OL-Pcdh)	mOLe11	Volle Länge	U88549	(Hirano et al. 1999)
Pcdh19	TOPOII-mPcdh19	2895	NM001105245	(Gaitan und Bouchard 2006)

Gen	Name des Plasmids	Sondenlänge (bp)	Gen-Bank Zugangsnummer	Literatur
Sonic Hedgehog (Shh)	TOPOII-mSHH	1117	NM009170.3	(Echelard et al. 1993)

**4.1.5 Lösungen zum Fixieren und Einfrieren des Gewebes**

<b>HBS (1x)</b>	HBS-Stammlösung (10x)	100ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,1M
	MgCl <sub>2</sub>	0,1M
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<b>Formaldehyd (4%) in HBS</b>	PFA	4% w/v
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800ml
	PFA in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> bei 60°C lösen	
	HBS-Stammlösung (10x)	100ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,1M
	MgCl <sub>2</sub>	0,1M
	pH-Wert auf 7,4 auf 1l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	

**Saccharoselösungen**

<i>Saccharose-Lösung (12%)</i>	Saccharose	12g
	HBS-Lösung (1x)	100ml
<i>Saccharose-Lösung (15%)</i>	Saccharose	15g
	HBS-Lösung (1x)	100ml
<i>Saccharose-Lösung (18%)</i>	Saccharose	18g
	HBS-Lösung (1x)	100ml

**4.1.6 Lösungen für *In-situ*-Hybridisierung und Doppel-*in-situ*-Hybridisierung**

<b>Antikörperlösung (ISH und DISH)</b>	PBS (1x)	300µl
	Schafserum	1% v/v
	Natriumazid (10%)	0,2% v/v
	Anti-Digoxigenin-AP	1:2000
	Anti-Fluorescein-AP	1:2000

<b>Blockierungslösung (ISH)</b>	PBS (1x)	5ml
	Schafserum, normal	2% v/v
<b>Blockierungslösung (DISH)</b>	MAB (1x)	600µl
	Schafserum, hitzeinaktiviert	8% v/v
	Blocking-Reagenz	2% w/v
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	DEPC	1%
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
	über Nacht rühren	
	autoklavieren	
<b>Essigsäureanhydridlösung (ISH)</b>	DEPC-H <sub>2</sub> O	150ml
	Triethanolamin	2,26g
	HCl <sub>konz.</sub>	380µl
	Essigsäureanhydrid	380µl
<b>Essigsäureanhydridlösung (DISH)</b>	Triethanolamin	0,1M
	Essigsäureanhydrid	375µl
<b>Fast-Red-Lösung</b>	Fast Red Chromogen	2mg
	Naphtolsubstrat	0,5mg
	Levamisol	0,4mg
	Tris-HCl, pH 8,0	2ml
<b>50% Formamid/2xSSC-Lösung</b>	Formamid	50% v/v
	SSC-Lösung (2x)	1x v/v
<b>Hybridisierungslösungen</b>		
<i>Hybridisierungslösung A (ISH)</i>	Formamid	50%v/v
	EDTA	10mM
	SSC-Stammlösung (20x)	3x v/v
	Denhardt's-Lösung (50x)	1x v/v

	Dextransulfat (50%)	10% w/v
	DEPC-H <sub>2</sub> O	33µl
<i>Hybridisierungslösung A</i> (DISH)	Tris-Base	10mM
	NaCl	600mM
	EDTA	1mM
	SDS	0,25% w/v
	Denhardt's-Lösung (50x)	1x v/v
	Dextransulfat (50%)	10% w/v
	Formamid	50%v/v
<i>Hybridisierungslösung B</i> (ISH)	Hefe-tRNA	42µg/ml
	Lachs-DNA	42µg/ml
	Sonde	1µg/ml
	10min bei 95°C inkubieren	
	Hybridisierungslösung A (300µl/OT)	
	mit Hybridisierungslösung B mischen	
<i>Hybridisierungslösung B</i> (DISH)	Hefe-tRNA	200µg/ml
	Lachs-DNA	42µg/ml
	Sonde	1µg/ml
	10min bei 95°C inkubieren	
	Hybridisierungslösung A (300µl/OT)	
	mit Hybridisierungslösung B mischen	
<b>Lösung für feuchte Kammer</b> (ISH und DISH)	Formamid	50% v/v
	SSC-Stammlösung (20x)	1x v/v
	DEPC-H <sub>2</sub> O	8ml
<b>Mowiolmedium</b>	Mowiol 4-88	13,3% w/v
	Glycerin	30% w/v
	Tris-HCl	0,1M
	DABCO	25mg/ml
	pH-Wert auf 8,5	



<b>NTE-Lösung (1x)</b>	NTE-Stammlösung (5x)	200ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	800ml
<b>Formaldehydlösung (4%)</b>	PFA	1,3M
	PBS (1x)	500ml
<b>PBS-Lösung (1x)</b>	PBS-Stammlösung (10x)	100ml
	DEPC-H <sub>2</sub> O	900ml
<b>Proteinase K-Lösung</b>	Proteinase K	1mg/ml
	Proteinase K-Puffer	150ml
<b>Puffer</b>		
<i>Proteinase K-Puffer</i>	Tris-Base	100mM
	EDTA	50mM
	pH-Wert auf 8,0	
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O	
<i>Puffer 3</i>	Tris-Base	100mM
	NaCl	100mM
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50mM
	pH-Wert auf 9,5	
	auf 1l mit DEPC-H <sub>2</sub> O	
	vor Gebrauch 1M MgCl <sub>2</sub> zugeben	
<i>Puffer 4</i>	Tris-Base	10mM
	EDTA	1mM
	pH-Wert auf 8,0	
	auf 1l mit DEPC-H <sub>2</sub> O	
<b>RNase-Lösung</b>	NTE-Lösung (1x)	150ml
	RNase A	320µg/ml

<b>SSC-Lösung (0,1x)</b>	SSC-Stammlösung (20x)	5ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	995ml
<b>SSC-Lösung (2x)</b>	SSC-Stammlösung (20x)	100ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	900ml
<b>SSC-Lösung (5x)</b>	SSC-Stammlösung (20x)	250ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	750ml
<b>Substratlösung</b>	Puffer 3	5ml
	BCIP	0,02% w/v
	NBT	0,03% w/v
<b>TBS-Lösung (1x)</b>	TBS-Stammlösung (10x)	100ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	100ml

#### 4.1.7 Lösungen für Azan-Färbung

<b>Anilin-Alkohol</b>	Ethanol (100%)	100% w/v
	Anilinöl	1ml
<b>Anilinblau-Orange-G-Stammlösung</b>	Anilinblau	0,5% w/v
	Orange-G	2% w/v
	Aqua <sub>dest.</sub>	100ml
	Essigsäure	8% v/v
	aufkochen, abkühlen und filtrieren	
	zum Färben 1:1 bis 1:3 mit Aqua <sub>dest.</sub> verdünnen	
<b>Azokarmin-G-Lösung</b>	Azokarmin-G	1000µg/ml
	Aqua <sub>dest.</sub>	100ml
	aufkochen, abkühlen und filtrieren	
	Essigsäure	1% v/v

<b>Essigsäure-Alkohol</b>	Ethanol (96%)	96% w/v
	Essigsäure	1% v/v
<b>HBS-Puffer (10x)</b>	NaCl	1,4M
	KCl	50mM
	Glucose	50mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4mM
	Phenolrot	0,4mM
	HEPES	0,1M
	pH-Wert auf 7,4	
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<b>Formaldehyd (4%) in HBS</b>	PFA	4% w/v
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	800ml
	PFA in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> bei 60°C lösen	
	HBS-Stammlösung (10x)	100ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,1M
	MgCl <sub>2</sub>	0,1M
	pH-Wert auf 7,4	
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<b>Phosphorwolframsäure</b>	mit Aqua <sub>dest.</sub> mischen, bis 5%ige Lösung (w/v) entsteht	

#### 4.1.8 Stammlösungen

<b>HBS-Stammlösung (10x)</b>	NaCl	1,4M
	KCl	50mM
	Glucose	50mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4mM
	Phenolrot	0,4mM
	HEPES	0,1M
	pH-Wert auf 7,4	
	auf 1l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	

<b>MAB-Stammlösung (10x)</b>	Maleinsäure	1M
	NaCl	2,5M
	pH-Wert auf 7,5	
<b>NTE-Stammlösung (5x)</b>	Tris-Base	5mM
	EDTA	5mM
	NaCl	2,5M
	auf 1l mit DEPC-H <sub>2</sub> O pH-Wert auf 8,0	
<b>PBS-Stammlösung (10x)</b>	NaCl (75,95g/l)	1,3M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	70mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	30mM
	auf 1l mit DEPC-H <sub>2</sub> O pH- Wert auf 7,4	
<b>SSC-Stammlösung (20x)</b>	NaCl	3M
	Na-Citrat	0,3M
	auf 1l mit DEPC-H <sub>2</sub> O	
	pH-Wert auf 7,0	
<b>TBS-Stammlösung (10x)</b>	NaCl	1,5M
	Tris-Base	0,5M
	auf 1l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
	pH-Wert auf 7,4	

#### **4.1.9 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software**

##### **Geräte**

Kryostat (HM560 Cryo-Star)	Microm GmbH, Walldorf
Kamera, Digital (Olympus DP70)	Olympus GmbH, Hamburg
Mikroskop, Durchlicht (BX40)	Olympus, Hamburg
Mikroskop, konfokales Laser- Scanning (SP5; CLSM)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Mikroskop, Stereo (Stemi 2000)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop, Stereo (Stemi SV11)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reinstwasseranlage (Milli-Q)	Millipore Merck, Darmstadt
Thermomixer (Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (Mini Vortex)	VWR, Radnor, USA
Wasserbad (TW8)	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge (MiniSpin®)	Eppendorf, Hamburg

### **Verbrauchsmaterialien**

Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Deckgläser 24x50mm (Größe 1.5)	Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x60mm (Größe 1)	Menzel GmbH, Braunschweig
Dekontaminationsreagenz RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Objektträger Super Frost® Plus	Menzel GmbH, Braunschweig
Verschlussfolie Parafilm M®	Bemis Company, Neenah, USA

### **Software**

Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH, München
Endnote X7	Thomas Reuters, Toronto, Kanada
Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft Word 2010	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Olympus cellSens	Olympus GmbH, Hamburg

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Präparation, Fixation und Einfrieren des Mausgewebes**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Labormäuse (*Mus musculus*) des Stammes *C57b16/J*. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten durch die Service-Einheit Kleinnager des Universitätsklinikums Jena bereitgestellt: Am Embryonalentwicklungstag (E)12,5; E14,5; E16,5; am Tag der Geburt (P0) und am postnatalen Tag 5 (P5). Gemäß §4 des Tierschutzgesetzes erfolgte die Tötung der trächtigen Muttertiere und der postnatalen Tiere schmerzlos durch Dekapitation

nach Betäubung durch Chloroform und wurde von einer dafür befugten Person durchgeführt. Die gesamte Prozedur entsprach dabei den nationalen Gesetzen und institutionellen Richtlinien. Die anschließende Präparation wurde auf Eis und unter einem Stereomikroskop vorgenommen.

Bei den embryonalen Stadien wurde zunächst der Uterus des trächtigen Muttertieres eröffnet und die Embryonen entnommen. Bei den Stadien E12,5 und E14,5 wurde der gesamte Körper verwendet, bei dem Stadium E16,5 nur der Kopf. Bei den postnatalen Stadien erfolgte zunächst die Entfernung der Haut. Für das Stadium P5 wurde zusätzlich die Schnauze freipräpariert und einzeln verwendet, um eine bessere Diffusion der Fixationslösungen durch das Gewebe gewährleisten zu können.

Die Präparate wurden zunächst zwecks Fixation über Nacht in 4% Formaldehyd-Lösung auf Eis auf einem Taumelschüttler gelagert und anschließend durch die Saccharose-Reihe (4h 12% Saccharose, 4h 15% Saccharose, über Nacht 18% Saccharose) geführt. Darauf erfolgte die Überführung und achsengerechte Orientierung der Gewebeproben in ein zylindrisches Aluminiumgefäß, welches mit Tissue Tek gefüllt war. Das Gefäß wurde langsam in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.2 Anfertigen von Kryostatschnitten**

Das vorbereitete Präparat wurde aus dem Gefrierschrank (-80°C) in die Kammer des Kryostats überführt und der Temperatúrausgleich abgewartet. Beim Schneiden wurden die Objekt- und Messertemperatur je nach Außentemperatur und Luftfeuchtigkeit auf -11°C bis -13°C eingestellt. Das Schneiden erfolgte in frontaler Schnittebene und bei einer Schnittdicke von 14µm. Die Schnitte wurden alternierend aufgenommen. Während des Schneidens wurden die Objektträger (OT) auf einer RNase-Away-behandelten Wärmeplatte bei 37°C gelagert und verblieben dort nach dem Schneiden für mindestens 1h zum Trocknen. Anschließend folgte die Lagerung bei -80°C.

### 4.2.3 In-situ-Hybridisierung

#### Prinzip

Die *In-situ*-Hybridisierung beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von mRNA in Zellen/Gewebe direkt in der jeweiligen Struktur (*in situ*) mittels Basenpaarung (Hybridisierung). Voraussetzung hierfür ist eine markierte Sonde mit einer zur Ziel-mRNA komplementären Basensequenz. Diese Sonde wird auf das Zielgewebe aufgetragen und bindet an die Ziel-mRNA. In dieser Versuchsreihe handelte es sich um eine Markierung mit Digoxigenin, einem Steroid des roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) und des wolligen Fingerhuts (*Digitalis lanata*). An diese Markierung binden nun über Inkubation spezifische Antikörper ( $\alpha$ -Digoxigenin). Der hier verwendete Antikörper ist mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt, welche ein zugegebenes Substrat farblich umsetzt. Ist also innerhalb des Gewebes ein (Proto-)Cadherin aktiv, ist in der Zelle die für die Expression nötige mRNA vorhanden. An diese mRNA binden die markierten Sonden und können anschließend im Gewebe farblich nachgewiesen werden.

#### Vorbereitung

Da Nukleinsäuren an Silikate binden, ist eine Silikonisierung nötig, um die unspezifische Bindung der Sonden an die Deckgläser (Silikate) zu verhindern. Hierzu wurden die unbehandelten Deckgläser 20min in 0,2M HCl-Lösung inkubiert, in 100% Ethanol eingetaucht und 15min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Im nächsten Schritt wurden sie für 5h bei 180°C gebacken. Nach einer Abkühlphase wurden sie anschließend für wenige Sekunden in eine Silikonlösung eingetaucht und für erneut 2h bei 120°C gebacken. Die Lagerung erfolgte staubfrei.

#### Ablauf

Die Schnitte wurden zunächst 30min in 4% Formaldehyd-Lösung auf Eis fixiert und anschließend 2x5min in 1xPBS-Lösung gewaschen. Daraufhin folgte eine 5-minütige Inkubation in Proteinase K-Lösung, gefolgt von 5min Waschen in 1xPBS-Lösung. Der nächste Schritt beinhaltete erneut eine Fixation in 4% Formaldehyd-Lösung auf

Eis für 30min. Danach wurde 5min mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurden die Schnitte 20min in Essigsäureanhydridlösung acetyliert und 2x5min in 1xPBS-Lösung gewaschen. Für die nun folgende Hybridisierung wurden 300µl der Hybridisierungslösung auf jeden OT aufgetragen und mit einem silikonisierten Deckglas bedeckt. Die Inkubation mit spezifischer Sondenbindung erfolgte über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag wurden die OT zum Ablösen der Deckgläser zunächst 10min bei RT in 5xSSC gewaschen. Darauf folgte ein Waschschrift in 5xSSC bei 60°C und 50% Formamid/2xSSC-Lösung für 60min bei 60°C. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 3x10min in 1xNTE-Puffer bei 37°C äquilibriert, 30min in RNase A-Lösung bei 37°C inkubiert und erneut 10min in NTE-Puffer bei 37°C gewaschen. Als nächstes folgte eine erneute Inkubation in 50% Formamid/2xSSC-Lösung bei 60°C. Zur Temperaturanpassung wurden die Schnitte 30min in 0,1xSSC bei RT gewaschen und anschließend 2x5min in 1xPBS-Lösung behandelt. Nun wurde auf jeden OT 1ml Blockierungslösung aufgetragen und für 30min bei RT inkubiert, um die Färbung des Hintergrundes zu reduzieren. Schließlich wurde die Blockierungslösung abgekippt, 300µl Antikörperlösung pro OT aufgetragen und mindestens 1h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Diese Zeit diente der spezifischen Anbindung der Antikörper an die markierten Sonden. Darauf folgte eine Waschreihe mit 3x20min in 1xTBS-Lösung und 10min in Puffer 3. Nun wurde pro OT 1ml Substratlösung aufgetragen und im Dunkeln bei 4°C über Nacht inkubiert.

Im Laufe des nächsten Tages wurden die Schnitte einzeln unter dem Stereomikroskop begutachtet und die Reaktion bei optimaler Farbentwicklung in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> abgestoppt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe (10min 70% Ethanol, 2-3min 96% Ethanol, 1min 100% Ethanol, 2x10min Xylol) entwässert und anschließend in Entellan eingedeckt.

#### **4.2.4 Doppel-in-situ-Hybridisierung**

##### Prinzip

Der biochemische Hintergrund der DISH entspricht dem Prinzip der ISH (s.4.2.3, S.33). Allerdings kommt zusätzlich eine zweite Sonde zum Einsatz, deren Bindung im Gewebe von der ersten Sonde differenziert darstellbar sein muss. Dazu ist sie mit



Fluorescein, einem fluoreszierenden Farbstoff aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe, markiert. So ist es möglich, innerhalb des Gewebes 2 verschiedene Moleküle nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde Sonic Hedgehog (Shh), ein Marker des primären Schmelzknotens (pSK), mit Cdh6, Cdh11 und Pcdh19 gepaart, um eine Koexpression von Shh mit diesen (Proto-)Cadherinen nachzuweisen. Dieser Nachweis verifiziert die Expression der untersuchten (Proto-)Cadherine im pSK.

### Ablauf

Nach der Fixierung der Schnitte für 10min in 4% Formaldehyd-Lösung auf Eis folgte eine Waschung für 2x5min in 1xPBS-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte für 5min in Proteinase K-Lösung inkubiert und 2x5min in 1xPBS-Lösung gewaschen. Darauf folgte erneut eine Fixation in 4% Formaldehyd-Lösung auf Eis für 5min. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 2x5min in 1xPBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie 10min in Essigsäureanhydridlösung acetyliert und 2x5min in 1xPBS-Lösung gewaschen. Nach dem Spülen in DEPC-H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte ca. 30min bei RT vollständig getrocknet. Für die anschließende Hybridisierung wurde auf jeden OT 300µl der Hybridisierungslösung aufgetragen und mit einem silikonisierten Deckglas bedeckt. Inkubiert wurde über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser bei RT in 5xSSC abgelöst und 10min gewaschen. Es folgte das Waschen in 50% Formamid/1xSSC-Lösung bei 60°C für 30min. Anschließend wurden die Schnitte 10min in 1xNTE-Puffer bei 37°C äquilibriert, 30min in RNase A-Lösung bei 37°C inkubiert und erneut 10min in 1xNTE-Puffer bei 37°C gewaschen. Darauf wurden sie 20min in 2xSSC und 2x20min in 0,2xSSC bei je 60°C gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in 1xMAB bei RT und für 1h in 5% HISS/MAB-Lösung mit 10% Blocking-Reagenz behandelt. Schließlich wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht mit der ersten Antikörperlösung ( $\alpha$ -Digoxigenin-AP) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 1x5min in 1xMAB bei RT gespült und 3x5min gewaschen. Darauf folgte eine Behandlung in Puffer 3 für 10min bei RT. Anschließend wurden die Schnitte zur Substratumsetzung über Nacht bei 4°C mit der Substratlösung inkubiert.

Nach der Inkubation folgten 2x5min Waschen in 1xPBS, 10min Fixieren in 4% Formaldehyd-Lösung/PBS und erneut 2x5min Waschen in 1xPBS. Der nächste Schritt beinhaltete 2x5min Waschen in 1xMAB und 1h Blockierung in der Blockierlösung. Anschließend wurden die Schnitte mit der zweiten Antikörperlösung ( $\alpha$ -Fluorescein-AP) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3x5min in 1xMAB bei RT behandelt. Zur Darstellung des Fluoresceins wurden sie dann in einer Lösung mit 0,1mg/ml Fast Red über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am letzten Tag folgten 2x5min Waschen in 1xPBS, 10min Fixieren in 4% Formaldehyd-Lösung/PBS und erneut 2x5min Waschen in 1xPBS. Der letzte Schritt beinhaltete eine Kernfärbung für 5min in Hoechst 34580 (Verdünnung 1:1000).

Zum Abschluss wurden die Schnitte in Aqua<sub>dest.</sub> gespült und in Mowiol eingedeckt.

#### **4.2.5 Azan-Färbung**

##### Prinzip

Die Azanfärbung ist eine Übersichtsfärbung und leitet sich von den beiden Farbstoffen Azokarmin und Anilinblau-Orange-G ab. Das saure Azokarmin dient der Kernfärbung. Saure Farbstoffe sind negativ geladen und binden daher an positiv geladene (basische) Strukturen. Aufgrund der hohen Anzahl basischer Proteine im Zellkern wird das Azokarmin dort besonders fest gebunden. Auch das Anilinblau und Orange-G sind saure Farbstoffe, jedoch mit unterschiedlicher Diffusionsgröße. Das Orange-G dringt daher in das gesamte Gewebe ein (wird aber vom Azokarmin überdeckt), während das Anilinblau nur das Bindegewebe färbt. Das Ergebnis der Azanfärbung sind rot gefärbte Zellkerne, blassrotes Zytoplasma, blaues kollagenes und retikuläres Bindegewebe und rot gefärbte Muskelzellen.

##### Ablauf

Die Schnitte wurden zunächst 15min in 4% Formaldehyd-Lösung/HBS inkubiert und anschließend 2x in Aqua<sub>dest.</sub> gewaschen. Im nächsten Schritt wurden sie bei 56°C für 10-15min in Azokarmin gefärbt und erneut in Aqua<sub>dest.</sub> gespült. Um die Färbung zu differenzieren, wurden die Schnitte 30min in Anilin-Alkohol entfärbt. 30-60sec

Waschen in Essigsäurealkohol stoppte den Färbeprozess. Anschließend wurden die Schnitte 1-3h in Phosphorwolframsäure inkubiert. Nach einem Spülgang in Aqua<sub>dest.</sub> folgte die zweite Färbephase in Anilinblau-Orange-G (1-3h) und ein erneutes Waschen in Aqua<sub>dest.</sub>. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe (10min 70% Ethanol, 2-3min 96% Ethanol, 1min 100% Ethanol, 2x10min Xylol) entwässert und anschließend in Entellan eingedeckt.

#### **4.2.6 Mikroskopie und Erstellen digitaler Bilder**

Die ISH-Schnitte und die histologischen Präparate wurden am Durchlichtmikroskop begutachtet und mit der dazugehörigen Olympus Digitalkamera DP70 und Software Olympus cellSens aufgenommen. Die Mikroskopie und Fotografie der DISH-Schnitte erfolgten am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Die digitalen Bilder wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop in Kontrast und Helligkeit optimiert, beschriftet und, bei Bedarf nötigenfalls, Ausschnitte angefertigt und maßstabsgerecht vergrößert.

## 5. Ergebnisse

Die Auswertung betrifft den ersten Molaren des Unterkiefers und beschreibt dabei vorrangig die Gewebe/Strukturen, die direkt zur Zahnanlage gehören. In dieser Versuchsreihe wurden die Stadien E12,5 zur Darstellung der generellen Zahnleiste (gZL), E14,5 für das Knospenstadium, E16,5 für das Kappenstadium und P0 für das Glockenstadium verwendet. Zusätzlich wurde das Stadium P5 als postnatales Stadium gewählt.

Die Ergebnisse werden für jedes Cadherin (Cdh) und Protocadherin (Pcdh) einzeln dargestellt. Für einen Vergleich der Cadherine innerhalb eines Stadiums siehe Tabellen 2-6 (S.50).

Zur Verifizierung der Expression von Cdh6, Cdh11 und Pcdh19 innerhalb des pSK wurde eine DISH-Färbung des jeweiligen (Proto-)Cadherins mit Sonic Hedgehog (Shh) durchgeführt (Abb.10). Shh dient als Marker des pSK (s.4.2.4, S.34).

### 5.1 Histologische Strukturen der Odontogenese (Azan)

Die Azanfärbung ist eine Übersichtsfärbung. Dabei stellen sich Zellkerne und Muskelzellen rot, Zytoplasma blassrot und kollagenes sowie retikuläres Bindegewebe blau dar (s.4.2.5, S.36).

#### *Stadium E12,5*

Im Leistenstadium der Zahnentwicklung sind die gZL (Abb.8 A) und das darunter liegende determinierte Zahnmesenchym (dZME) aus der Neuralleiste (Abb.8 A) differenzierbar.

#### *Stadium E14,5*

Es ist die ausgebildete Zahnknospe sichtbar. Innerhalb der Knospe lassen sich zwei verschiedene Zelltypen unterscheiden. Die äußeren Epithelzellen (äEZ) und die inneren Epithelzellen (iEZ; Abb.8 B). Des Weiteren zeigt sich die Kondensierung des dZME rund um die Zahnknospe (Abb.8 B).

*Stadium E16,5*

Die Entwicklung der Zahnknospe ist zur Kappenform fortgeschritten. Diese Struktur, auch Schmelzorgan genannt, hält über die Zahnleiste (ZL) Kontakt mit dem Mundhöhlenepithel (Abb.8 C). Das Schmelzorgan setzt sich aus dem äußeren Schmelzepithel (äSE) und dem inneren Schmelzepithel (iSE) zusammen. Zwischen beiden Schichten sind die Zellen der Schmelzpulpa (SP) erkennbar. Innerhalb des iSE ist eine Epithelverdickung sichtbar, der primäre Schmelzknoten (pSK; Abb.8 C). Das Epithel des Schmelzorgans proliferiert und umfasst das dZME. Dieser umschlossene Mesenchymanteil bildet die Zahnpapille (ZP; Abb.8 C). Deutlich erkennbar ist eine Verdichtung derjenigen Mesenchymzellen der ZP, die dem Schmelzorgan zugewandt sind. Diese stellen die Präodontoblasten (POD) dar (Abb.8 C). Die schmale Mesenchymverdichtung, die die gesamte Zahnanlage umgibt, ist das Zahnsäckchen (ZS). Peripher der Zahnanlage beginnt sich, an seiner blauen Färbung erkennbar, der Alveolarknochen zu differenzieren.

*Stadium P0*

Durch weiteres Wachstum hat das Schmelzorgan die Form einer Glocke angenommen. Die ZL ist weiterhin vorhanden (Abb.8 D). Die Zellen des iSE haben sich zu den hochprismatischen Präameloblasten (PAM) differenziert. Die sekundären Schmelzknoten (sSK) sind histologisch nicht erkennbar. Am apikalen Ende der Glocke ist die SP verdrängt und das äSE und die PAM liegen direkt aufeinander. Diese Region stellt sich als Hertwig-Epithelscheide (HES) dar. Die ZP ist weitläufiger vom Schmelzorgan umfasst als im vorherigen Stadium (Abb.8 D). Die Zellen der POD haben sich z.T. zu Odontoblasten (OD) differenziert ((P)OD, Abb.8 D). Erkennbar ist auch ihre palisadenartige Anordnung. Der bläulich schimmernde Streifen zwischen PAM und OD ist das kollagenreiche Prädentin, mit dessen Sekretion die OD begonnen haben. Das ZS umgibt weiterhin die Zahnanlage. Die bereits beschriebene Ossifikation des Alveolarknochens ist nun deutlich vorangeschritten.

*Stadium P5*

Die Strukturen der postnatalen Zahnentwicklung entsprechen denen des Glockenstadiums. Die PAM haben sich z.T. zu AM differenziert ((P)AM, Abb.8 E). Durch die vorangeschrittene Sekretion der OD ist die blaue Prädentinschicht

deutlicher erkennbar (Abb.8 E). Die Spaltbildungen zwischen Prädentin und (P)AM sowie zwischen Prädentin und OD stellen schnitttechnisch bedingte Artefakte dar.

## **5.2 Cadherin 2-Expression (Cdh2)**

### *Stadium E12,5*

Im Bereich der gZL ist keine Färbung des Epithels sichtbar. Das dZME weist eine leichte Färbung auf (Kreuz, Abb.8 F).

### *Stadium E14,5*

Die iEZ sind vereinzelt Cdh2-positiv (Pfeilspitzen, Abb.8 G und Tab.3). Die äEZ zeigen keine Expression. Das dZME weist eine Färbung auf (Kreuz, Abb.8 G).

### *Stadium E16,5*

Einzelne Zellen der SP sind Cdh2-positiv (Pfeilspitzen, Abb.8 H), das iSE und äSE zeigen keine Expression. Die ZP und das ZS sind Cdh2-positiv (langer und kurzer Pfeil, Abb.8 H). Die Expression innerhalb der ZP wird Richtung POD stärker (langer Pfeil, Abb.8 H).

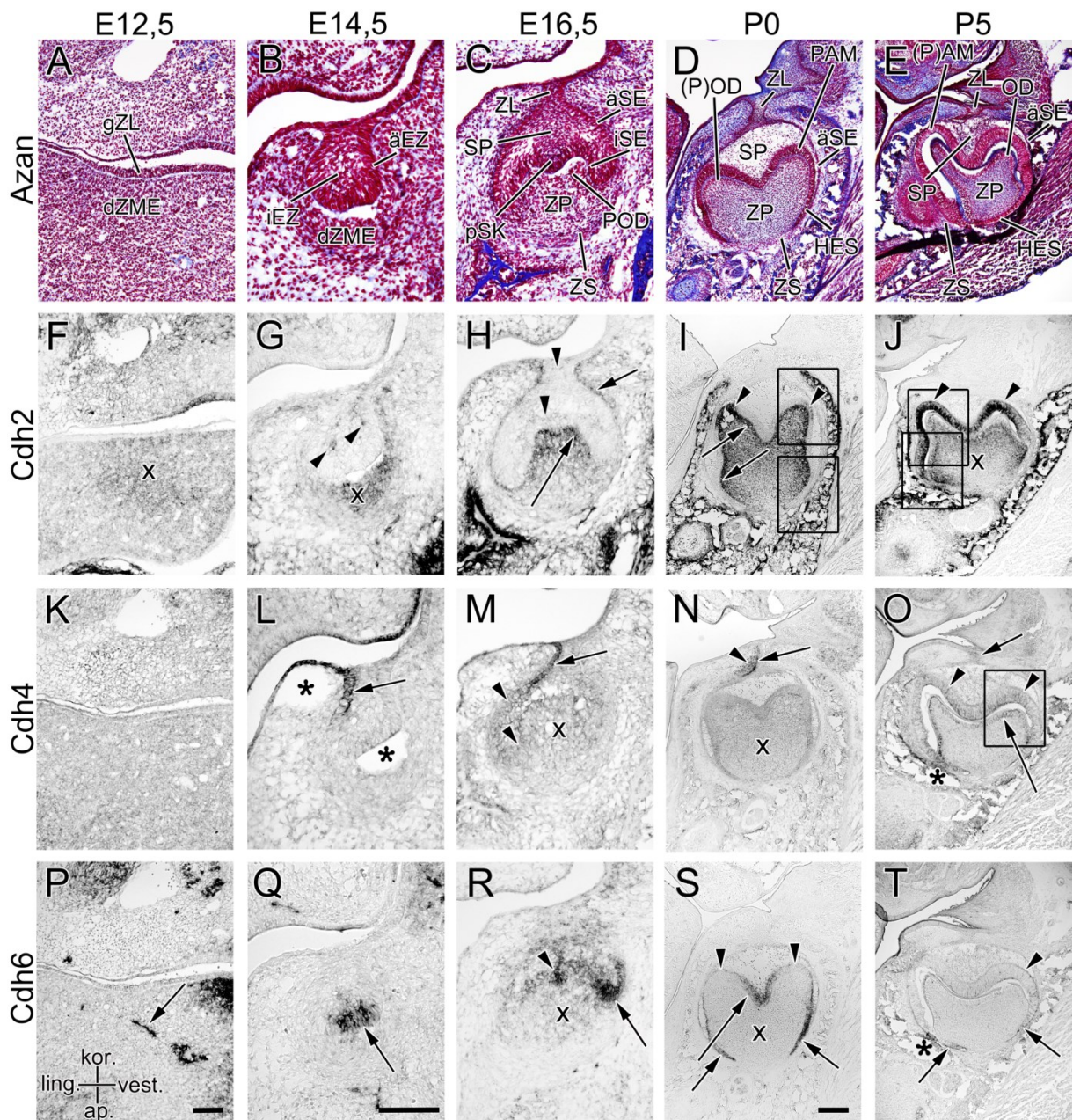
### *Stadium P0*

In der PAM-Schicht zeigen die koronal gelegenen Zellen eine Expression (Pfeilspitzen, Abb.8 I). Innerhalb der Zellen nimmt die Expression Richtung SP zu (Pfeilspitze, Abb.9 A). Das restliche Schmelzorgan ist Cdh2-negativ. Das Gewebe der ZP weist eine ausgeprägte Expression auf, die im Bereich der (P)OD am stärksten ist (Pfeile, Abb.8 I). Die Expression ist im Bereich der koronalen OD intensiv (Pfeil, Abb.9 A) und nimmt nach apikal hin ab (Pfeil, Abb.9 B).

### *Stadium P5*

Die AM sind Cdh2-positiv (Pfeilspitzen, Abb.8 J). Diese Expression befindet sich hauptsächlich auf der ZP-nahen Zellseite (Pfeilspitze, Abb.9 C). Das Mesenchym der ZP exprimiert weiterhin Cdh2 (Kreuz, Abb.8 J). Die Schicht der OD ist ebenfalls Cdh2-positiv und es herrscht intrazellulär eine in Richtung ZP gewandte Expression vor (Pfeil, Abb.9 C und kurzer Pfeil, Abb.9 D). Dabei ist die Expression der OD auf

Höhe der HES stärker und konzentriert sich auf die ZP-ferne Zellseite (langer Pfeil, Abb.9 D und Tab.6).



**Abbildung 8** Azanfärbung (A-E) und Expressionsmuster von Cdh2 (F-J), Cdh4 (K-O) und Cdh6 (P-T) während der Odontogenese der Maus in verschiedenen Entwicklungsstadien (E12,5-P5). Die Sternchen in L, O und T kennzeichnen Artefakte. Die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt und die Symbole im Text erklärt (gilt für Abbildung 8-11). Die umrahmten Bereiche in I, J und O werden vergrößert als Detailaufnahme in Abbildung 9 gezeigt. Richtungskreuz in P (für A-T). Messbalken: 100µm in P (für A, C, F, H, K, M, P und R); 100µm in Q (für B, G, L und Q); 200µm in S (für D, E, I, J, N, O, S und T).

### **5.3 Cadherin 4-Expression (Cdh4)**

#### *Stadium E12,5*

Es ist keine Expression im Bereich der Zahnanlage erkennbar (Abb.8 K).

#### *Stadium E14,5*

Auf der lingualen Seite der Zahnknospe weisen die äEZ eine Expression auf (Pfeil, Abb.8 L). Sie beginnt im Bereich der späteren ZL und läuft bis in das Mundhöhlenepithel. Dieses Expressionsmuster für Cdh4 wurde auf anderen Schnitten bestätigt und ist keine Folge der Artefakte in L (Sternchen, Abb.8 L). Das restliche Gewebe ist ungefärbt.

#### *Stadium E16,5*

Das asymmetrische Expressionsmuster des Knospenstadiums ist weiterhin sichtbar (Pfeil, Abb.8 M und Tab.4). Das iSE und äSE sind leicht gefärbt (Pfeilspitzen, Abb.8 M). Die ZP und POD sind schwach Cdh4-positiv (Kreuz, Abb.8 M)

#### *Stadium P0*

Die beschriebene Lateralisierung ist weiterhin sichtbar: Lingual zeigt das äSE im Bereich der ZL eine Expression auf (Pfeil, Abb.8 N und Tab.5). Das angrenzende Mesenchym des ZS ist in diesem Stadium ebenfalls Cdh4-positiv (Pfeilspitze, Abb.8 N). Ansonsten ist das Schmelzorgan expressionslos. Die ZP weist eine leichte Expression des Cadherins auf (Kreuz, Abb.8 N).

#### *Stadium P5*

Innerhalb der ZL zeigt sich eine sehr schwache Färbung (kurzer Pfeil, Abb.8 O und Tab.6). Eine Lateralisierung ist nicht mehr erkennbar. Das äSE und die SP sind nicht gefärbt. Die (P)AM sind Cdh4-positiv (Pfeilspitzen, Abb.8 O). Die Expression innerhalb dieser Zellen nimmt zur ZP hin zu (Pfeilspitze, Abb.9 E). Auch die OD-Schicht ist gefärbt (langer Pfeil, Abb.8 O und Pfeil, Abb.9 E). Die ZP und das ZS sind Cdh4-negativ.



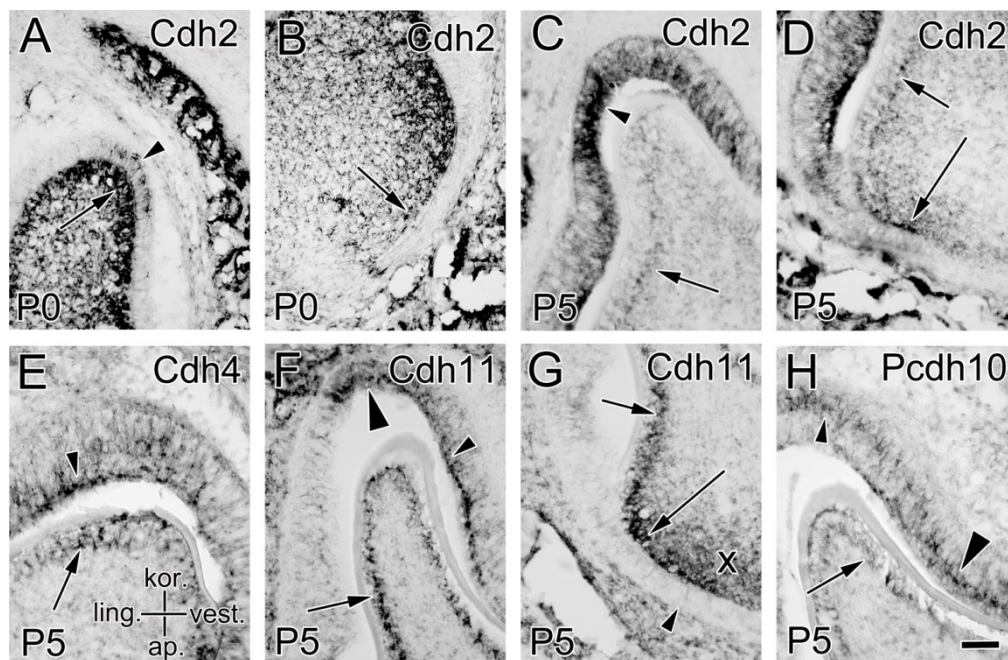
## 5.4 Cadherin 6-Expression (Cdh6)

### Stadium E12,5

Die gZL ist Cdh-6-negativ. Das dZME ist ebenfalls expressionslos. Die angefärbte Struktur innerhalb des dZME ist nicht näher differenzierbar (Pfeil, Abb.8 P).

### Stadium E14,5

Die äEZ der Zahnknospe zeigen eine Färbung. Diese Färbung beschränkt sich auf den Bereich des sich bildenden pSK (Pfeil, Abb.8 Q und Tab.3). Die Koexpression von Cdh6 und Shh im pSK bestätigt dieses Expressionsmuster (Pfeilspitze, Abb.10 A). Das restliche Gewebe ist ungefärbt.

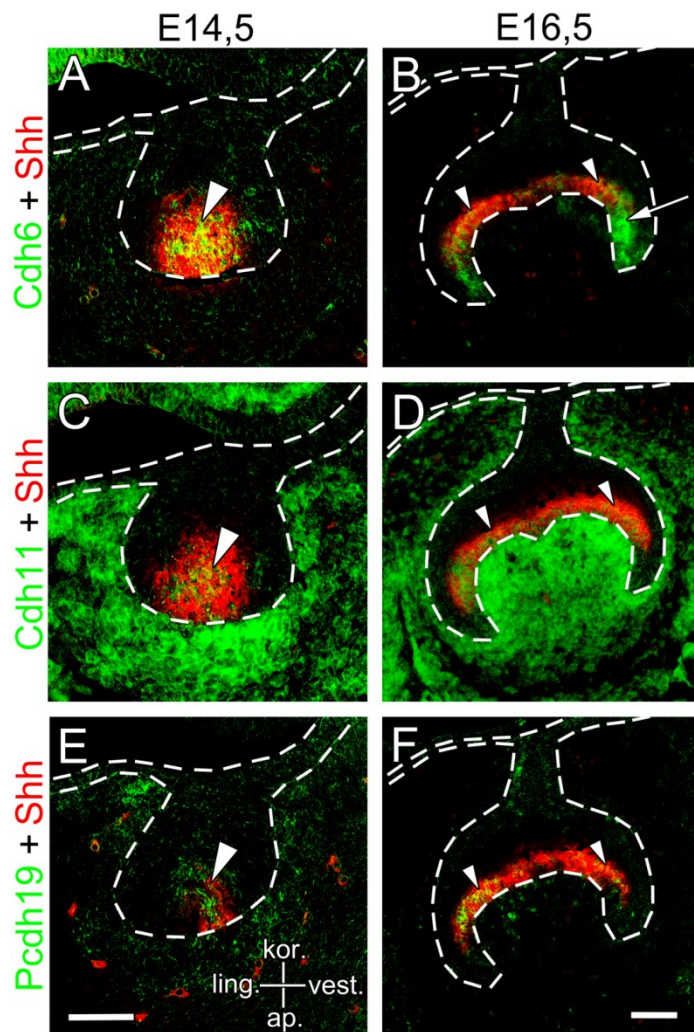


**Abbildung 9** Detailaufnahmen der Expressionsmuster von Cdh2 im Stadium P0 (A und B) und P5 (C und D), Cdh4 im Stadium P5 (E), Cdh11 im Stadium P5 (F und G) und Pcdh10 im Stadium P5 (H) während der Odontogenese der Maus. Die Abbildungen zeigen die mit Rahmen markierten Bereiche in Abbildung 8 I, J (für Cdh2) und O (für Cdh4) sowie in Abbildung 11 E (für Cdh11) und O (für Pcdh10) in höherer Vergrößerung. Richtungskreuz in E (für A-H). Messbalken: 50µm in H (für A-H).

### Stadium E16,5

Außer der ZL und dem pSK sind alle Teilbereiche des Schmelzorgans Cdh6-positiv. Besonders ausgeprägt ist die Expression im Bereich des iSE (Pfeilspitze, Abb.8 R) und am Übergang vom iSE zum äSE (Pfeil, Abb.8 R). Der Vergleich mit dem

Expressionsmuster von Shh bestätigt, dass die Expression von Cdh6 nicht im pSK liegt (Pfeilspitzen, Abb.10 B), da sich die Expression von Shh nicht mit der von Cdh6 deckt (Pfeil, Abb.10 B). Die ZP und POD weisen eine leichte Färbung auf (Kreuz, Abb.8 R).



**Abbildung 10** Vergleich der Expression von Shh mit Cdh6 (A und B), Cdh11 (C und D) und Pcdh19 (E und F) während der Odontogenese der Maus in verschiedenen Entwicklungsstadien (E14,5 und E16,5) durch Doppel-*in-situ*-Hybridisierung. Rot verweist auf die Expression von Shh als Marker des pSK (Hinweis: Es ist zu beachten, dass im Stadium E16,5 bereits ein Übergang von pSK zu sSK möglich ist, wodurch sich der pSK nicht als klassische Verdickung des iSE darstellt). Grün verweist auf die Expression von Cdh6, Cdh11 oder Pcdh19. Gelb zeigt eine Koexpression von Shh und dem entsprechenden (Proto-)Cadherin an. Die gestrichelten Linien umrahmen die Zahnknospe (A, C und E) und Zahnkappe (B, D und F) sowie das daran angrenzende Mundhöhlenepithel. Richtungskreuz in E (für A-F). Messbalken: 50µm in E (für A, C und E); 75µm in F (für B, D und F).

### Stadium P0

Die PAM-Schicht ist Cdh-6-positiv. Dabei findet sich die Expression vor allem lokalisiert zwischen den zukünftigen Höckern (langer Pfeil, Abb.8 S) und an der HES (kurze Pfeile, Abb.8 S). An den koronalen Stellen der PAM-Schicht ist keine Färbung vorhanden (Pfeilspitzen, Abb.8 S). Die ZP ist leicht gefärbt (Kreuz, Abb.8 S), das restliche Gewebe ist expressionslos.

### *Stadium P5*

Es findet sich eine Expression im verdichteten, dem iSE anliegenden, *Stratum intermedium* (SI; Pfeilspitze, Abb.8 T und Tab.6). Die Expression in der HES ist weniger stark als im Stadium P0 (Pfeile, Abb.8 T). Der Rest der Zahnanlage erscheint Cdh6-negativ.

## **5.5 Cadherin 11-Expression (Cdh11)**

### *Stadium E12,5*

Die gZL ist homogen gefärbt (Pfeil, Abb.11 A und Tab.2). Auch das dZME weist eine intensive Cdh11-Expression auf (Kreuz, Abb.11 A).

### *Stadium E14,5*

Die äEZ der Zahnknospe sind leicht gefärbt (Pfeilspitzen, Abb.11 B). Die DISH-Färbung von Cdh11 und Shh zeigt zusätzlich eine Expression des Cadherins im sich bildenden pSK (Pfeilspitze, Abb.10 C). Gründe für diese nicht sichtbare Cdh11-Expression im Schnittbild der ISH-Färbung können eine abweichende Schnittachse oder eine geringere Entwicklung der Zahnknospe sein. Das dZME ist ebenfalls Cdh11-positiv und stärker gefärbt als das periphere, nicht kondensierte Mesenchym (Kreuz, Abb.11 B).

### *Stadium E16,5*

Das gesamte Schmelzorgan ist leicht gefärbt, im Bereich des pSK ist die Expression stärker (Pfeilspitze, Abb.11 C). Die Koexpression von Cdh11 und Shh im pSK verifiziert diese Expression des Cadherins im pSK (Pfeilspitzen, Abb.10 D). ZS und ZP sind intensiv gefärbt. Die Expressionsstärke der ZP nimmt zu den POD hin zu (Pfeil, Abb.11 C).

### *Stadium P0*

Innerhalb des Schmelzorgans ist nur die PAM-Schicht leicht gefärbt (Pfeilspitzen, Abb.11 D). ZP und ZS sind weiterhin Cdh11-positiv. Der im Stadium E16,5 beschriebene Expressionsgradient innerhalb der ZP stellt sich in diesem Stadium stärker ausgeprägt dar (Pfeile, Abb.11 D).

*Stadium P5*

ZL, äSE und SP weisen keine Expression von Cdh11 auf. Die Zellschicht der (P)AM ist Cdh11-positiv (Pfeilspitze, Abb.11 E und große Pfeilspitze, Abb.9 F). Die Stärke der Expression nimmt zur HES hin ab (Pfeilspitze, Abb.9 G). Innerhalb der (P)AM liegt die Expression auf der ZP-nahen Zellseite (kleine Pfeilspitze, Abb.9 F). Auch die OD-Schicht weist eine Färbung auf (Pfeil, Abb.11 E und Pfeil, Abb.9 F). Die Expressionsstärke nimmt aber zur HES hin zu (langer Pfeil, Abb.9 G). Innerhalb der OD ist die Expression auf die Zellseite konzentriert, die Richtung ZP zeigt (kurzer Pfeil Abb.9 G). Im Bereich der HES konzentriert sich die Expression aber auf die der ZP abgewandte Zellseite (langer Pfeil, Abb.9 G). Im Mesenchym der ZP ist ein nach apikal zunehmender Expressionsgradient vorhanden (Kreuz, Abb.11 E; Kreuz, Abb.9 G und Tab.6). Das ZS ist Cdh11-positiv.

**5.6 Protocadherin 7-Expression (Pcdh7)***Stadium E12,5*

Das gesamte Mundhöhlenepithel weist eine Pcdh7-Expression auf (Pfeil, Abb.11 F und Tab.2). Auch das dZME ist gefärbt (Kreuz, Abb.11 F).

*Stadium E14,5*

Die äEZ der Zahnknospe weisen eine leichte Expression auf (Pfeilspitzen, Abb.11 G). Die iEZ sind ungefärbt. Das sich kondensierende dZME ist leicht Pcdh7-positiv (Kreuz, Abb.11 G).

*Stadium E16,5*

Innerhalb des Schmelzorgans ist im iSE eine Pcdh7-Expression sichtbar (Pfeilspitze, Abb.11 H). Das restliche Schmelzorgan ist sehr leicht gefärbt. Das ZS ist Pcdh7-positiv (Pfeil, Abb.11 H). Die ZP und POD sind ebenfalls leicht gefärbt (Kreuz, Abb.11 H).

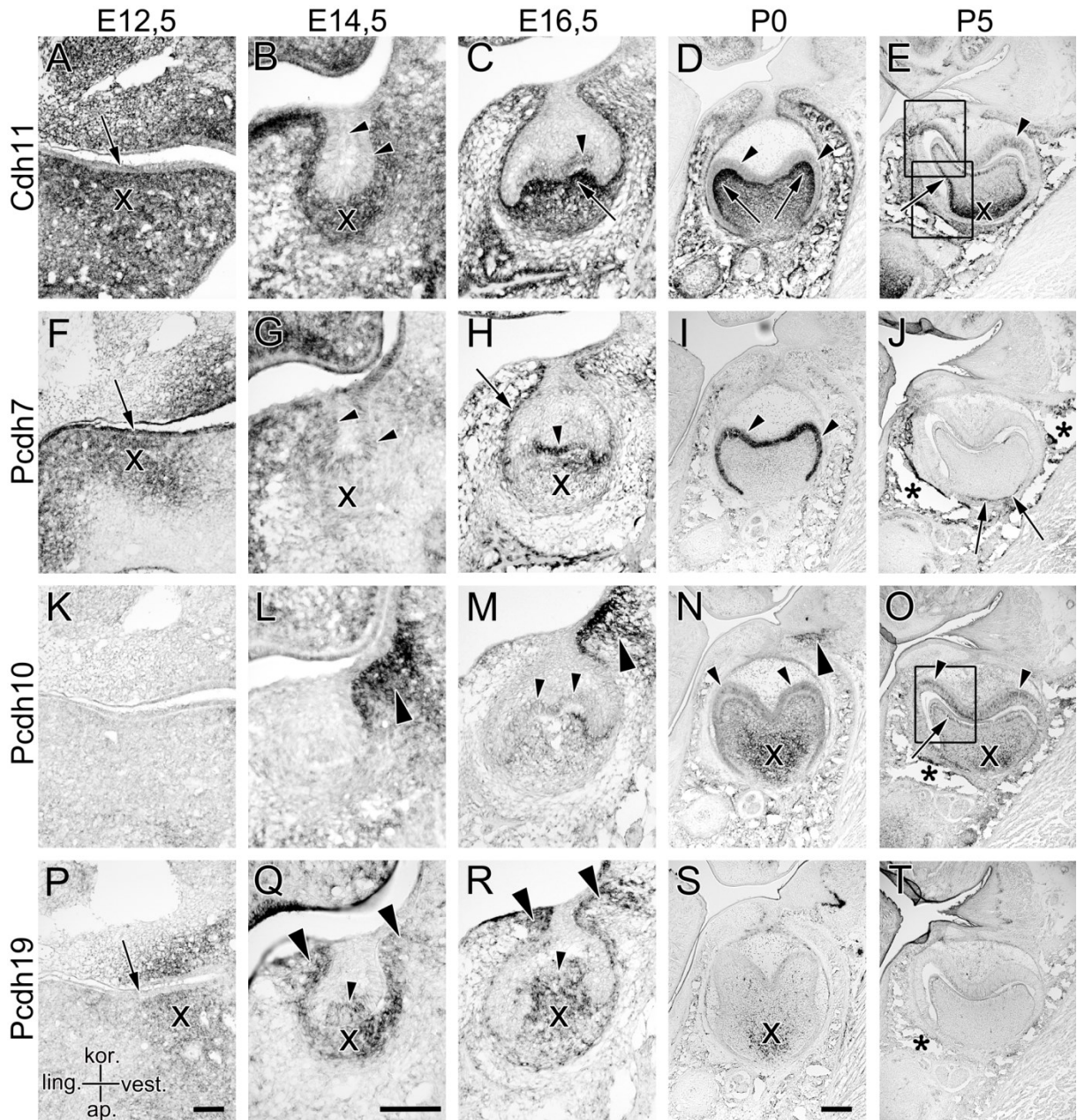
*Stadium P0*

Die PAM-Zellreihe weist eine homogene Expression auf (Pfeilspitzen, Abb.11 I). Alle anderen Gewebe stellen sich expressionslos dar (Tab.5).



*Stadium P5*

Die HES weist beidseits eine leichte Pcdh7-Expression auf (Pfeile, Abb.11 J). Die restliche Zahnanlage ist ungefärbt (Tab.6).



**Abbildung 11** Expressionsmuster von Cdh11 (A-E), Pcdh7 (F-J), Pcdh10 (K-O) und Pcdh19 (P-T) während der Odontogenese der Maus in verschiedenen Entwicklungsstadien (E12,5-P5). Die Sternchen in J, O und T kennzeichnen Artefakte. Die Rahmen in E und O stellen den vergrößerten Bereich der Detailaufnahmen in Abbildung 9 dar. Richtungskreuz in P (für A-T). Messbalken: 100µm in P (für A, C, F, H, K, M, P und R); 100µm in Q (für B, G, L und Q); 200µm in S (für D, E, I, J, N, O, S und T).

## **5.7 Protocadherin 10-Expression (Pcdh10)**

### *Stadium E12,5*

Sowohl die gZL als auch das dZME weisen keine Expression von Pcdh10 auf (Abb.11 K).

### *Stadium E14,5*

Die Zahnknospe ist Pcdh10-negativ (Tab.3). Vestibulär der Knospe weist das dZME im Bereich der Vestibularleiste eine Pcdh10-Expression auf, die auch das angrenzende, nicht kondensierende Mesenchym einschließt (große Pfeilspitze, Abb.11 L). Innerhalb dieses Expressionsfeldes nimmt die Färbung zum Mundhöhlenepithel hin an Intensität zu. Das restliche Mesenchym ist ungefärbt.

### *Stadium E16,5*

Im Schmelzorgan ist das iSE schwach gefärbt (kleine Pfeilspitzen, Abb.11 M). Der Rest des Schmelzorgans ist Pcdh10-negativ. Das mesenchymale Expressionsfeld im Bereich der Vestibularleiste stellt sich auch in diesem Stadium dar (große Pfeilspitze, Abb.11 M). ZP, POD und ZS sind leicht gefärbt.

### *Stadium P0*

Innerhalb des Schmelzorgans sind die PAM leicht gefärbt (kleine Pfeilspitzen, Abb.11 N). In der ZP ist eine Färbung sichtbar, die nach apikal intensiver wird (Kreuz, Abb.11 N). Eine mesenchymale Expression im Bereich der Vestibularleiste ist sichtbar, aber weniger ausgeprägt als in den vorherigen Stadien (große Pfeilspitze, Abb.11 N). Das ZS ist ungefärbt.

### *Stadium P5*

Die (P)AM weisen eine Färbung auf (Pfeilspitzen, Abb.11 O und Tab.6). Innerhalb der (P)AM sind regional unterschiedliche Expressionsmuster sichtbar. Bei den koronal gelegenen (P)AM konzentriert sich die Expression auf die ZP-ferne Zellseite (kleine Pfeilspitze, Abb.9 H). Je weiter apikal die (P)AM liegen, desto stärker konzentriert sich die Expression auf die ZP-nahe Seite der (P)AM (große Pfeilspitze, Abb.9 H). Die Reihe der OD ist ebenfalls Pcdh10-positiv (Pfeil, Abb.11 O). Intrazellulär liegt die Färbung auf der Zellseite, die Richtung ZP zeigt (Pfeil, Abb.9 H).

Das Mesenchym der ZP weist einen nach apikal zunehmenden Expressionsgradienten auf (Kreuz, Abb.11 O). Das ZS ist Pcdh10-negativ.

## **5.8 Protocadherin 19-Expression (Pcdh19)**

### *Stadium E12,5*

Die gZL ist Pcdh19-negativ (Pfeil, Abb.11 P). Das dZME zeigt jedoch eine Expression von Pcdh19. Das Expressionsfeld liegt leicht vestibulär der gZL (Kreuz, Abb.11 P).

### *Stadium E14,5*

Innerhalb der Zahnknospe ist in dem sich bildenden pSK eine Färbung sichtbar (kleine Pfeilspitze, Abb.11 Q). Der Vergleich mit der Expression von Shh zeigt zwar eine geringe Koexpression von Pcdh19 und Shh, bestätigt aber das Expressionsmuster von Pcdh19 (Pfeilspitze, Abb.10 E). Die restlichen Bereiche der Knospe sind ungefärbt. Das dZME ist Pcdh19-positiv (Kreuz, Abb.11 Q). Auf Höhe der späteren ZL reicht diese Expression bis in das periphere, nicht kondensierte Mesenchym (große Pfeilspitzen, Abb.11 Q).

### *Stadium E16,5*

Der Bereich des pSK ist expressionspositiv (kleine Pfeilspitze, Abb.11 R). Die Koexpression von Pcdh19 und Shh im pSK verifiziert dieses Expressionsmuster (Pfeilspitzen, Abb.10 F). Das restliche Schmelzorgan ist Pcdh19-negativ. Die ZP, POD und das ZS weisen eine Färbung auf (Kreuz, Abb.11 R und Tab.4). Auf Höhe der ZL reicht, wie im Stadium E14,5, die Expression bis in das periphere, nicht kondensierte Mesenchym (große Pfeilspitzen, Abb.11 R).

### *Stadium P0*

Das Schmelzorgan weist keine Expression von Pcdh19 auf (Tab.5). Die ZP ist Pcdh19-positiv, das Expressionsfeld beschränkt sich aber auf den apikalen Bereich der ZP (Kreuz, Abb.11 S). Das ZS ist expressionslos.

### *Stadium P5*

Es ist keine Expression von Pcdh19 erkennbar (Abb.11 T und Tab.6).

**Tabelle 2** Expressionsmuster der (Proto-)Cadherine im Stadium E12,5

<b>E12,5</b>	Cdh2	Cdh4	Cdh6	Cdh11	Pcdh7	Pcdh10	Pcdh19
gZL	-	-	-	+ / ++	++	-	-
dZME	+	-	-	++	+ / ++	-	+ / +++*

**Tabelle 3** Expressionsmuster der (Proto-)Cadherine im Stadium E14,5

<b>E14,5</b>	Cdh2	Cdh4	Cdh6	Cdh11	Pcdh7	Pcdh10	Pcdh19
iEZ	+/-	-	-	-	-	-	-
äEZ	-	++*	++*	+/-	+	-	++*
dZME	++	-	-	++	+	++ / +++*	++

**Tabelle 4** Expressionsmuster der (Proto-)Cadherine im Stadium E16,5

<b>E16,5</b>	Cdh2	Cdh4	Cdh6	Cdh11	Pcdh7	Pcdh10	Pcdh19
ZL	-	++*	-	- / +	+/-	-	-
äSE	-	++*	+ / +++*	- / +	+/-	-	-
iSE	-	+	+ / +++*	++	+ / +++*	+	-
SP	+/-	+/-	+	- / +	+/-	-	-
pSK	-	-	-	++	-	-	+ / ++
ZP	+ / +++*	+	+/-	++ / +++*	+ / +++*	+	+ / ++
POD	++	+	+/-	+++	++	+	++
ZS	+	-	-	++	+ / +++*	++ / +++*	+ / +++*

**Tabelle 5** Expressionsmuster der (Proto-)Cadherine im Stadium P0

<b>P0</b>	Cdh2	Cdh4	Cdh6	Cdh11	Pcdh7	Pcdh10	Pcdh19
ZL	-	++*	-	-	-	-	-
äSE	-	++*	-	-	-	-	-
PAM	+	-	++*	+	++	+	-
SP	-	-	-	-	-	-	-
ZP	+	+/-	+/-	++ / +++*	-	+ / +++*	+
ZS	++*	++*	-	++	-	-	-
(P)OD	+++*	+/-	-	++ / +++*	-	+	-
HES	-	-	++	+	-	-	-

**Tabelle 6** Expressionsmuster der (Proto-)Cadherine im Stadium P5

<b>P5</b>	Cdh2	Cdh4	Cdh6	Cdh11	Pcdh7	Pcdh10	Pcdh19
ZL	-	+/-	-	-	-	-	-
SI	-	-	+	-	-	-	-
äSE	-	-	-	-	-	-	-
SP	-	-	-	-	-	-	-
ZP	+ / +++*	-	-	++ / +++*	-	+ / +++*	-
ZS	+	-	-	+	-	-	-
(P)AM	++ / +++*	+ / +++*	-	+ / +++*	-	++*	-
OD	+ / +++*	+ / +++*	-	++ / +++*	-	+ / +++*	-
HES	++	+/-	+	-	+ / ++	+ / ++	-

**Legende für Tabellen 2-6** Folgende Zeichen werden in den Tabellen verwendet: -, keine Expression; +/-, sehr schwache Expression; +, geringe Expression; ++, mittlere Expression; +++, starke Expression; \*, regionale Unterschiede der Expressionsstärke.



## **6. Diskussion**

Wie die Ergebnisse zeigen, sind alle untersuchten Cadherine und Protocadherine während der Odontogenese der Maus innerhalb der Zahnanlage nachweisbar. Bei dieser ubiquitären Beteiligung gibt es aber bestimmte Expressionsmuster, die aufgrund ihrer Spezifität und/oder Individualität genauer betrachtet werden sollten, da aus ihnen mögliche Funktionen der Cadherine abgeleitet werden können. Die daraus hervorgehenden Hypothesen behandeln asymmetrische Expressionsmuster, molekulare Wechselwirkungen innerhalb der Zahnanlage, dynamische Expressionsmuster, die Regulation reziproker Signalwege und die Regulation der Ameloblasten- sowie Odontoblastendifferenzierung. Diese sollen im Folgenden analysiert, interpretiert und diskutiert werden.

### **6.1 Sind Cadherine an der Ausbildung der asymmetrischen Morphologie und Topographie des Zahnes beteiligt?**

Die Expressionsmuster von Cdh4 und Pcdh10 zeigen eine Asymmetrie auf. Cdh4 ist lingual im Epithel der Zahnleiste (ZL; Abb.8 L-N) und Pcdh10 vestibulär im Mesenchym im Bereich der Vestibularleiste exprimiert (Abb.11 L-N). Expressionsmuster dieser Art waren bei keinem anderen untersuchten Cadherin zu finden. Daher ist eine mögliche Rolle von Cdh4 und Pcdh10 bei der asymmetrischen Morphogenese des Zahnes zu diskutieren.

Zähne sind keine symmetrischen Gebilde. Vor allem die Molaren zeichnen sich durch eine ungleichmäßige Form mit asymmetrischer Anordnung der Fissuren und Höcker aus. Diese Form und deren exakte Ausbildung während der Odontogenese sind zwingend notwendig, um eine regelrechte Okklusion und damit ein funktionierendes Kauorgan zu schaffen. Die entsprechenden molekularen Mechanismen sind wenig untersucht. Wie bereits beschrieben, sorgt der Schmelzknoten (SK) für ein asymmetrisches Wachstum innerhalb des inneren Schmelzepithels (iSE) und ist so an der Bildung der nichtsymmetrischen Form der Molaren beteiligt (s.2.2.3, S.6). Diese Schlussfolgerung basiert auf der asymmetrischen BrdU-Inkorporation von Zellen des iSE (Obara und Lesot 2007). Während des Kappenstadiums gibt es eine Diskrepanz zwischen der BrdU-positiven, lingualen Seite des Schmelzorgans und

der BrdU-negativen, vestibulären Seite. Die Folge ist ein asymmetrisches Wachstum des Schmelzorgans, des SK, und der sich daraus entwickelnden Zahnkrone.

Die asymmetrische BrdU-Inkorporation als Beispiel ungleichmäßigen Wachstums der Zahnanlage korreliert mit den Beobachtungen von Desmoglein, einer Untergruppe der Cadherin-Superfamilie. Das Expressionsmuster von Desmoglein konzentriert sich im Knospenstadium auf die vestibuläre Seite der Epithelknospe. Die linguale Seite ist expressionslos (Cam et al. 2002).

Derartige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die asymmetrische Ausformung der Molaren auf entsprechenden molekularen Vorgängen basiert. Es ist evident, dass es im Laufe der Odontogenese eine Abweichung von symmetrisch ablaufenden Prozessen geben muss. Die Signale, die das asymmetrische Wachstum induzieren, müssen noch vor Beginn der Zahnhartsubstanzbildung gesendet werden. Wie bereits dargestellt, steht die Zahnmorphologie im Zuge der SK-Bildung irreversibel fest. Die Expressionsmuster von Cdh4 und Pcdh10 entsprechen diesen Kriterien. Beide zeigen eine Abweichung symmetrischer Expression. Diese ist bei beiden Molekülen bereits ab dem Knospenstadium, also noch vor der histologisch sichtbaren Ausbildung des pSK, feststellbar. Daher ist es wahrscheinlich, dass sowohl Cdh4 als auch Pcdh10 an asymmetrischen Wachstumsprozessen beteiligt sind.

Die generelle Beteiligung der Cadherine an asymmetrischen Wachstumsprozessen ist bereits bekannt. Beim Huhn reguliert Cdh2 (N-Cdh) die viszerale Links-Rechts-Asymmetrie, indem es die linkswärtige Wanderung von Zellen des Primitivknotens (ein Organisationszentrum der Embryogenese) stoppt (Mendes et al. 2014). Lin et al. (2013) untersuchten die Rolle der Protocadherine bei der Entwicklung der Hühnerfeder, die sich ebenfalls asymmetrisch entwickelt. Im Epithel der Federknospe stellten sie ein asymmetrisches Expressionsmuster von Pcdh19 fest. Es gibt daher einen Zusammenhang zwischen asymmetrischen Körperstrukturen und den entsprechenden molekularen Mechanismen, die diese Asymmetrie regulieren.

Bei der Odontogenese wird Cdh4 in der ZL und daher innerhalb der Zahnanlage exprimiert. Ein direkter Einfluss auf die Morphologie des Zahnes ist daher wahrscheinlich. Anders verhält es sich bei Pcdh10. Das Expressionsfeld grenzt unmittelbar an die Vestibularleiste an, reicht aber bis zur Zahnanlage. Ein direkter Einfluss auf die Morphologie des Zahnes ist daher unwahrscheinlich. Eine Beteiligung an der Ausbildung des Vestibulums im Zusammenhang mit der Zahnanlage ist jedoch theoretisch möglich. Eine enge Beziehung zwischen

Vestibularleiste und Zahnanlage beobachtete bereits die Gruppe um Hovorakova et al. (2005), die unter anderem eine Expression des Transkriptionsgens DLX-7 sowohl in Vestibularleiste als auch Zahnleiste feststellten. Pcdh10 würde daher zwar nicht die Zahnform direkt beeinflussen, aber dessen Lage und Ausrichtung in der Mundhöhle. Die Position der Zähne ist eine asymmetrische, da sie zwischen Vestibulum und Gaumen/Zunge liegen. Um diese angrenzenden Strukturen auszubilden und die Zähne in den dazu korrekten topographischen Kontext zu bringen, sind auch hier molekulare Prozesse nötig, die asymmetrischen Mustern folgen.

In dieser Arbeit wurden erstmals asymmetrische Expressionsmuster von Cadherinen während der Zahnentwicklung gezeigt. Ihr möglicher Einfluss betrifft nicht nur die Zahnform, sondern zusätzlich die topographische Lage des Zahnes. Die molekularen Abläufe und Signalkaskaden, die Folge dieser einseitigen Expressionen sind, waren nicht Gegenstand dieser rein deskriptiven Arbeit. Inwiefern Cdh4 und Pcdh10 spezifisch die Odontogenese beeinflussen, kann Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

## **6.2 Die Expression von Cdh6 weist auf eine molekulare Wechselwirkung zwischen Kronen- und Wurzelmorphologie hin**

Wie beschrieben, wird Cdh6 zu Beginn der Odontogenese nur im pSK und mit Beginn der Zahnhartsubstanzbildung ausschließlich in der Hertwig-Epithelscheide exprimiert (HES; Abb.8 Q-T). Die Expression in pSK und HES lässt eine molekulare Wechselwirkung zwischen Kronen- und Wurzelmorphologie vermuten.

Die duale Beteiligung von Cdh6 an Kronen- und Wurzelbildung ist ein Novum. Recherchen in der gegenwärtigen Literatur ergaben keine Beschreibung dieses Expressionsmusters für ein anderes Signalprotein. Die Notwendigkeit einer Verbindung dieser beiden zahnmorphologischen Prozesse erscheint aber logisch. Jernvall und Thesleff (2012) weisen darauf hin, dass Säugetiere heterodonte Lebewesen sind, deren Zähne sich evolutionsgeschichtlich den nötigen Anforderungen angepasst haben. Der Molar hat als nahrungsmahlender Zahn eine größere und komplexere Kronenform als der nahrungsteilende Inzisor. Durch die Größe und höheren Kräfte bedingt, zeigt der Molar der Maus mit zwei (Unterkiefer) bzw. drei Wurzeln (Oberkiefer) auch eine stärkere Verankerung im Kiefer als der

Schneidezahn mit einer Wurzel (Shimazu et al. 2009). Es müssen daher Prozesse stattfinden, die die Kronenbildung mitregulieren und die Ausbildung der dazu passenden Wurzelmorphologie steuern.

Verantwortlich für die Kronenform ist der pSK (Jernvall et al. 1994). Die Anzahl und Form der Wurzeln kontrolliert die HES (Huang und Chai 2012). Der Zahn mit seiner funktionsspezifischen Kronenmorphologie benötigt eine dazu angepasste Wurzelmorphologie, um seine Funktion ausführen zu können. Der Zusammenhang zwischen Kronenform- und Wurzelmorphologie muss daher auch durch eine entsprechend regulierende Genexpression manifestiert sein. Das setzt einen gemeinsamen Einfluss auf die entsprechenden Strukturen, also pSK und HES, voraus.

Ein Zusammenhang zwischen Cdh6 und der Ausbildung des pSK ist bisher nicht beschrieben. Der pSK steuert Zellproliferation und Zelldifferenzierung, indem er verschiedene Signalmoleküle exprimiert, die für die Ausbildung der Zahnkrone entscheidend sind. Die Regulation der Aktivität des pSK ist aber noch nicht hinreichend geklärt (Thesleff et al. 2001). Die Gruppe um Liu et al. (2008) erforschte Cdh6 bei der Retinaentwicklung des Zebrafisches. Das Fehlen des Cadherins führte dabei zu einer Störung der neuronalen Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch einen Abfall wichtiger Transkriptionsfaktoren. Cdh6 ist daher nachweislich an der Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt, indem es die Expression bestimmter Gene steuert. Cdh6, dessen Expression auch im pSK vorhanden ist (Abb.10 A), könnte dort eine ähnliche Funktion haben. Eine Beteiligung von Cdh6 an der Kronenbildung ist daher denkbar.

Auch die Beteiligung von Cdh6 an der Wurzelentwicklung ist möglich. Wie beschrieben, vollziehen einige Zellen der HES im Zuge der Wurzelbildung eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT; s.2.2.6, S.10) zu Zementoblasten (Akimoto et al. 2011, Lee et al. 2014). Die EMT ist ein wichtiger Bestandteil morphogenetischer Prozesse, wie beispielsweise der Zellmigration. Clay und Halloran (2014) wiesen bereits eine Beteiligung von Cdh6 an der EMT von Neuralleistenzellen nach. Die Beteiligung von Cdh6 an der EMT deutet daher bei der Odontogenese auf eine Beteiligung an den Prozessen der Wurzelentwicklung hin.

Es weist also vieles darauf hin, dass Cdh6 regulierenden Einfluss auf den pSK und die HES hat und daher eine Schlüsselrolle in der Zahnentwicklung spielt, indem es eine korrespondierende Morphogenese von Krone und Wurzel steuert. Allerdings

handelt es sich hierbei um Ergebnis basierte Vermutungen. Um diese Hypothese zu verifizieren und die Details der Funktion von Cdh6 zu klären, sind weitere Untersuchungen, beispielsweise mit transgenen Mäusen, notwendig. So könnten die Auswirkungen des Fehlens von Cdh6 auf die Zahnmorphologie untersucht werden.

### **6.3 Das dynamische Expressionsmuster der Protocadherine und seine möglichen Funktionen bei der Odontogenese**

Pcdh7 ist in den Präameloblasten (PAM) und Pcdh19 in der Zahnpapille (ZP) exprimiert. Diese Expression fällt im Verlauf der Odontogenese stark ab (Abb.11 F-J und P-T). Solche dynamischen Expressionsmuster sind Bestandteil entscheidender odontogenetischer Phasen. Sie betreffen die Ameloblastendifferenzierung (AM) und die Bildung der Zahnpapille (ZP).

Die Pcdh7-Expression innerhalb der PAM findet während deren präsekretorischen Phase statt. Die Differenzierung zu sekretorischen AM geht mit sehr komplexen (intra-)zellulären Veränderungen einher (s.2.2.5, S.8). Das setzt entsprechende molekulare Prozesse voraus, wie z.B. das Auflösen der Zell-Zell-Kontakte aus der präsekretorischen Phase, da in der folgenden sekretorischen Phase starke Zellbewegungen der AM dominieren (Sorkin et al. 2000). Die Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zellkontakten ist eine nachgewiesene Funktion von Pcdh7 (Yoshida 2003) und spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Zellstabilisierung in den PAM während der präsekretorischen Phase. Der Expressionsabfall findet also statt, weil die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte der PAM Voraussetzung für den Übergang in die sekretorische Phase sind. Dieses Ergebnis als Beispiel dynamischer Expression bestätigt vorangegangene Ergebnisse. Für Cdh1 (E-Cdh) sind Schwankungen der Expressionsstärke während der AM-Differenzierung bereits bekannt. Hier findet sich im Gegensatz zu den anderen Phasen während der Sekretionsphase und Reifephase eine starke Cdh1-Expression (Sorkin et al. 2000). Das zeigt die komplexen Vorgänge während der AM-Differenzierung und verdeutlicht, dass auch Pcdh7 dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Die Expression von Pcdh19 im kondensierenden dZME deutet auf einen wichtigen Einfluss bei der Bildung der ZP hin. Wie Jernvall et al. (2000) zeigten, ist der Übergang von der Zahnknospe zur Zahnkappe ein für die Zahnmorphologie entscheidender Schritt. Dabei ist die Kondensation des dZME Voraussetzung für das

Entstehen der ZP. Daher müssen die Zellen des dZME über entsprechende Zell-Zell-Kontakte verfügen, um diese Zellmigration zu vermitteln (Mammoto et al. 2011). Pcdh19 allein vermittelt nur sehr schwache Zelladhäsion (Tai et al. 2010). Beim Zebrafisch bildet Pcdh19 in der Gehirnentwicklung einen Komplex mit Cdh2 (N-Cdh) und vermittelt so starke Zelladhäsion und morphogenetische Zellbewegungen (Biswas et al. 2010). Das aufgezeigte mesenchymale Expressionsmuster von Pcdh19 und Cdh2 bei der Odontogenese der Maus zwischen E12,5 und E16,5 weist auf eine ähnliche Funktion hin (Abb.8 F-H und Abb.11 P-R). Eine zellmigratorische Funktion erscheint für Pcdh19 somit möglich. Nach Beendigung der Zellmigration und Kondensation des dZME in der ZP im Glockenstadium ist ein starker Abfall der Pcdh19-Expression zu beobachten. Diese Expressionsabnahme geht mit der Vollendung der ZP-Bildung einher und schafft somit möglicherweise die Grundlage für die Odontoblastendifferenzierung (OD).

Die Untersuchung von Pcdh7 und Pcdh19 macht die Bedeutung dynamischer Expression deutlich. Die Bildung der ZP und die AM-Differenzierung sind ebenso dynamische Prozesse und gehen mit komplexen Zellveränderungen einher. Es liegt nahe, dass die Cadherine hierbei morphogenetische Prozesse, wie Zelladhäsion, Zellsortierung und Zelldifferenzierung, vermitteln. Werden diese Funktionen nicht mehr benötigt, kommt es zu einer Herunterregulation der Expression.

#### **6.4 Cadherine könnten durch die Expression in Epithel und Mesenchym an der Regulation reziproker Signalwege beteiligt sein**

Aus dem Ergebnisteil geht hervor, dass Cdh6, Cdh11 und Pcdh19 sowohl im pSK als auch im darunterliegenden dZME bzw. der ZP exprimiert werden (Abb.8 Q und R; Abb.10 C und Abb.11 C,Q und R). Damit werden diese Moleküle sowohl in epithelialen Geweben (pSK) als auch in mesenchymalen Geweben (dZME/ZP) exprimiert. Es ist also zu diskutieren, ob diese Cadherine die epithelial-mesenchymalen Interaktionen steuern, die bei der Zahnentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Jernvall und Thesleff 2000).

Der SK, als Struktur des Epithels, ist an epithelial-mesenchymalen Interaktionen beteiligt und hat durch die Expression verschiedener Signalmoleküle maßgeblich Einfluss auf die Zahnmorphologie (Thesleff et al. 2001). Ziel der Signale ist auch das

Mesenchym der ZP, was besonders für die OD-Differenzierung entscheidend ist (Ruch et al. 1995). Viele dieser Signalmoleküle (z.B. Wnt oder FGF) interagieren nachweislich mit Cadherinen (Fagotto et al. 1996, Thesleff 2003, Kettunen und Thesleff 1998, El-Hariry et al. 2001). Die Wechselwirkung zwischen Epithel und Mesenchym findet aber nicht nur einseitig (SK Richtung dZME/ZP), sondern reziprok (auch dZME/ZP Richtung SK) statt (Thesleff 2003). Signale aus dem dZME/der ZP regulieren wiederum die Aktivität des SK (Kratochwil et al. 2002).

Durch diese wechselseitigen Signale wird eine regelrecht ablaufende Zahnentwicklung gewährleistet. Voraussetzung ist, dass diese Signale im Gleichgewicht bleiben. Daher sind Moleküle nötig, die diese reziproke Beeinflussung der beiden Gewebe regulierend im Gleichgewicht halten. Die Expressionsmuster der untersuchten Cadherine sprechen für eine solche Funktion.

Für die Cadherine ist diese hypothetische Funktion bei der Odontogenese neu. Eine solche Funktion legt auch das Expressionsmuster von Lef1 bei der Zahnentwicklung nahe. Lef1 ist ein Transkriptionsfaktor, der über Assoziation mit  $\beta$ -Catenin den Wnt-Signalweg beeinflusst, in welchen wiederum die Cadherine einbezogen sind (Heuberger und Birchmeier 2010). Bei der Zahnentwicklung der Maus weist die Zahnkappe eine Expression von Lef1 im SK und der darunter liegenden ZP auf. Das Expressionsmuster von Lef1 ist damit ein für die Zahnentwicklung entscheidender Faktor und gewährleistet die reziproke Wechselwirkung zwischen Epithel und Mesenchym (Sasaki et al. 2005, Kratochwil et al. 2002).

Die darlegten Beobachtungen weisen daher auf einen regulierenden Einfluss von Cdh6, Cdh11 und Pcdh19 auf die genannten reziproken Wechselwirkungen hin. Dieses Ergebnis ist möglicherweise ein weiteres Beispiel dafür, dass Cadherine durch ihre Beteiligung an molekularen Signalwegen an embryologischen Prozessen beteiligt sind. In der Odontogenese stellen sie wahrscheinlich einen wichtigen Faktor der Zahnmorphologie dar, da sie die Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym vermitteln können.

## **6.5 Regulieren Cadherine die Ameloblasten- und Odontoblastendifferenzierung, indem sie Zelladhäsion und Zellpolarität vermitteln?**

### *Ameloblastendifferenzierung*

Cdh2 und Cdh11 sind innerhalb der koronalen (P)AM-Schicht exprimiert, mit fortschreitender Entwicklung auch in der apikalen (P)AM-Schicht (Abb.8 I und J und Abb.11 E). Weiterhin ist in den (P)AM im Stadium P5 intrazellulär eine Expression von Cdh4 und Cdh11 auf der ZP-nahen Zellseite (Abb.9 E und F) sichtbar. Bei Cdh2 und Pcdh10 ist ein intrazellulärer Expressionswechsel zwischen den (P)AM-Polen erkennbar (Abb.9 A, C und H). Diese Expressionsmuster deuten darauf hin, dass Cadherine durch Vermittlung von Zelladhäsion und Zellpolarisation entscheidend an der AM-Differenzierung beteiligt sind.

Die AM-Differenzierung beginnt in den Höckerspitzen, damit die späteren Höcker des Zahnes die korrekte Lage und Form haben. Erst dann differenzieren auch weiter apikal gelegene AM. Die Expressionsmuster von Cdh2 und Cdh11 entsprechen diesem zeitlichen Ablauf. Bereits Heymann et al. (2002) untersuchten das Molekül Cdh2 und stellten in der PAM-Schicht eine starke Cdh2-Expression fest, die sie mit der AM-Differenzierung in Verbindung bringen konnten. Diese begann im Glockenstadium in den späteren Höckerspitzen und manifestierte sich mit fortlaufender Differenzierung auch in den apikalen Bereichen der PAM-Schicht. Verstraeten et al. (2013) fanden zusätzlich heraus, dass in Cdh2-negativen Zebrafisch-Mutanten die Zahnentwicklung mit der Differenzierung der zahnhartsubstanzbildenden Zellen stehen bleibt. Es ist daher anzunehmen, dass für den korrekten Ablauf der AM-Differenzierung die Cadherine eine wichtige Voraussetzung sind. Welche Funktion die Cadherine dabei genau ausüben könnten, soll im Folgenden diskutiert werden.

Ein Ansatzpunkt ist die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten während der Amelogenese. Im Allgemeinen ist Cdh2 während morphogenetischer Prozesse entscheidend an der Trennung verschiedener Zellgruppen beteiligt (Takeichi 1995). Da es mit der Schmelzbildung zu unterschiedlich gerichteten Bewegungen verschiedener AM-Reihen kommt, ist ein feinabgestimmtes Muster von Zell-Zell-Kontakten nötig (Bartlett et al. 2010). Die Expression von Cdh2 in den sich



differenzierenden AM lässt eine solche Aufgabe vermuten. Um diese Funktion zu bestätigen, ist es auch nötig zu klären, ob die Expression von Cdh2 während der gesamten Schmelzbildung erhalten bleibt.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Entstehung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität als Voraussetzung für die Schmelzsekretion und die Interaktion mit anderen Geweben. Wie beschrieben, wird unter Zellpolarität die Teilung der Zelle in eine apikale und basale (Syn. basolateral) Domäne verstanden (s.2.3.3, S.186). Die Entstehung der Polarität geht mit der Wanderung des Golgi-Apparates einher (Matsuo et al. 1992). Das Trans-Golgi-Netzwerk erhält die Polarität aufrecht, indem es die Vesikel, die für den Zellbau und -erhalt wichtig sind, in apikal und basolateral trennt (Tepass et al. 2001). Im Zuge der AM-Differenzierung entsteht eine solche Polarität. Die Zellen des iSE durchlaufen einen Polarisationsprozess, der mit Größenzunahme und regional konzentrierter Entwicklung zytoplasmatischer Organellen einhergeht, wie z.B. dem Auftreten von Mikrotubuli auf der ZP-nahen AM-Seite (Gritli-Linde et al. 2002, Katchburian und Holt 1972). Vor der Sekretion der Schmelzmatrix kommt es aber zusätzlich zu einem Polaritätswechsel, in dem der basale Pol der Zelle, der der Basalmembran aufliegt, zum apikalen Pol wird. Dieser Prozess ist nötig, damit die Schmelzmatrixproteine ausgeschleust werden können (Smith und Nanci 1995). So sind in reifen AM an dieser apikalen Zellseite zahlreiche Adhärenzkontakte zu finden (Smith 1979).

Die Expression von Cdh4 und Cdh11 auf der ZP-nahen AM-Zellseite steht also eng mit der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Zellpolarität in Verbindung. Der apikale, sezernierende Zellpol der AM ist ein Ort hochkomplexer Zellprozesse, die zur Sekretion der Schmelzmatrix führen. Daher erscheint es möglich, dass besonders dieser Zellpol durch entsprechende Adhärenzkontakte, wie die der Cadherine, stabilisiert wird. Zusätzlich ist diese ZP-nahe Expression aber auch als Vermittler apikal-gerichteter Vesikel zu erwägen. Indem diese Cadherine den Transport der Schmelzproteine und aller anderen beteiligten Moleküle intrazellulär lenken, könnten sie die Zellpolarität aufrechterhalten und den regelrechten Ablauf der Schmelzbildung garantieren. Dass Cadherine an derartigen Polarisationsprozessen beteiligt sind, ist bereits bekannt. Zum Beispiel vermittelt Cdh1 die Polarität von Epithelzellen, indem es die Rekrutierung von Vesikel transportierenden Mikrotubuli in die Richtung der Expression des Cadherins steuert (Nejsum und Nelson 2007).

Interessant erscheint das Expressionsmuster von Cdh2 und Pcdh10, mit dem *switch* der Expression zwischen den beiden AM-Zellpolen. Für Pcdh10 ist bisher kein derartiges Expressionsmuster beschrieben. Mehrere Untersuchungen postulierten bereits, dass die AM-Differenzierung nicht nur mit reziproken, epithelial-mesenchymalen Interaktionen einhergeht, sondern auch das *Stratum intermedium* (SI) als Signalgeber eine wichtige Rolle spielt (Koyama et al. 2001, Wise und Fan 1989). Daher ist die Polarisierung der AM nicht als ein einseitiger Prozess zu verstehen, der sich nur auf den Schmelz-sezernierenden Zellpol konzentriert. Die Differenzierung der AM wird also durch Signale unterschiedlicher Strukturen beeinflusst. Zu diesem Zwecke und zur korrekt ablaufenden Schmelzbildung scheint eine Polarisierung der Zellen also unabdingbar.

Zusammengefasst weist vieles darauf hin, dass die Beteiligung der Cadherine durch die hier dargestellten Expressionsmuster entscheidend zu Zelladhäsions- und Zellpolaritätsprozessen beitragen. Damit könnten sie ein wichtiger Bestandteil der AM-Differenzierung sein. Um die Details ihrer Funktion zu untersuchen, ist zu klären, welche Auswirkung eine Fehlfunktion eines dieser Moleküle auf die Morphogenese des Zahnes hat.

### *Odontoblastendifferenzierung*

Bei Cdh2 und Cdh11 ist eine Expression im Bereich der sich differenzierenden OD zu erkennen. Diese Expression betrifft zunächst die koronal liegenden (P)OD, zieht aber mit fortschreitender Zahnentwicklung nach apikal (Abb.8 H-J und Abb.11 C-E). Innerhalb der OD zeigt Pcdh10 eine Expression auf der ZP-nahen Zellseite (Abb.9 H). Bei Cdh2 und Cdh11 ist ein *switch* der intrazellulären Expression zwischen beiden Zellpolen sichtbar (Abb.9 C, D, F und G). Es lässt sich daher vermuten, dass Cadherine entscheidend an der OD-Differenzierung beteiligt sind. Dabei spielt die Aufrechterhaltung der Zellpolarität der OD eine wichtige Rolle.

Die OD-Differenzierung beginnt, wie die AM-Differenzierung, im Bereich der Höckerspitzen, da zunächst die Krone ausgebildet wird. Das Expressionsmuster von Cdh2 und Cdh11 korreliert also eng mit der Entwicklung der OD, da die Expression umso stärker wird, je weiter die Differenzierung der POD zu OD vorangeschritten ist. Diese Beobachtungen decken sich mit denen der Arbeitsgruppe um Heymann et al. (2002) zur menschlichen Zahnentwicklung. Mit Beginn des Glockenstadiums stellten

sie eine intensive Expression von Cdh2 in den sich differenzierenden OD fest. Diese Expression war in vorhergehenden Stadien sehr viel schwächer und beschränkte sich auf das koronale Mesenchym der ZP. Daher schlussfolgerten Heymann et al. für die expressionspositiven Zellen einen höheren Grad an Differenzierung.

Für Cdh11 sind keine vergleichbaren Untersuchungen bekannt. Wu et al. (2010) wiesen das Cadherin in mesenchymalen Zellen der ZP nach und postulierten eine mögliche Beteiligung an der Dentinogenese. Die starke Korrespondenz der Expressionsmuster von Cdh2 und Cdh11 deutet aber darauf hin, dass sowohl Cdh11 als auch Cdh2 an der OD-Differenzierung beteiligt sind.

Geschaffen und aufrechterhalten wird dieser Differenzierungsgrad durch die Polarisation der OD. Die Zellen nehmen an Größe zu und es kommt zu einer polarisierten Verteilung der Zellorganellen (Sasaki und Garant 1996). So wandert der Nucleus auf die ZP-nahe Zellseite und das Zytoskelett wird reorganisiert (Ruch et al. 1995). Zwischen den OD entstehen am ZP-fernen Zellpol viele interzelluläre Adhärenzkontakte (Lee et al. 2009). So bilden die OD eine Barriere zwischen dem Dentin und der Pulpa, die sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen, z.B. bei Karies, wichtig ist (Bleicher 2014). Spätestens mit der Dentinbildung wird diese Polarisation notwendig, da hierfür eine unterschiedliche Verteilung von Plasmamembranproteinen Voraussetzung ist. So nimmt der OD über seinen basalen (ZP-nahen) Zellpol  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ auf und gibt es apikal (ZP-fern) über  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Na-Austauscher in die Dentinmatrix ab (Bleicher 2014).

Diese Zellprozesse machen die Notwendigkeit der OD-Polarisierung deutlich. Die Expressionsmuster der Cadherine weisen darauf hin, dass Cadherine an dieser Polarisation direkt beteiligt sind. Sie könnten entsprechend Zell-Zell-Kontakte bilden und so die palisadenartige Reihe der OD stützen oder durch Aufrechterhaltung der Polarität die korrekte Verteilung der Plasmamembranproteine gewährleisten. Der *switch* der Expression deutet zusätzlich auf einen Polaritätswechsel hin, den die OD durchlaufen, ähnlich dem der AM. Derartige intrazelluläre Expressionsunterschiede bei der OD-Differenzierung sind für die Cadherine bislang nicht beschrieben.

Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass Cadherine auch bei der OD-Differenzierung eine wichtige Rolle spielen könnten. Sie scheinen die OD-Differenzierung zu fördern und den Differenzierungsgrad zu festigen, indem sie Adhäsion und Polarität dieser Zellen beeinflussen. Diese Funktionen sind eine

wichtige Grundlage für die Bildung des Dentins und würden die Cadherine zu einem bedeutsamen Faktor der Dentinogenese machen.

## **7. Schlussfolgerungen**

Die 7 untersuchten (Proto-)Cadherine sind während der Odontogenese der Maus sowohl räumlich als auch zeitlich omnipräsent. Sie sind von Beginn der Zahnentwicklung bis zur Bildung der Zahnhartsubstanzen in jeder Struktur der Zahnanlage vertreten. Dabei zeigt jedes Cadherin ein räumlich und zeitlich individuelles Expressionsmuster. Dieses dynamische Expressionsmuster weist auf einen Cadherin basierten, adhäsiven Code hin, der die Odontogenese entscheidend beeinflusst.

Es ist hervorzuheben, dass dieser Einfluss nicht nur einen bestimmten Abschnitt der Odontogenese betrifft. Stattdessen sind die Cadherine vielfältig und fortwährend in diesen Entwicklungsprozess involviert. Verdeutlicht wird dieses durch die abgeleiteten möglichen Funktionen: Sei es die Kondensation des determinierten Zahnmesenchyms zu Beginn der Zahnentwicklung, die Regulation des Schmelzknotens etwas später oder die abschließende Bildung der Zahnhartsubstanzen. Cadherine scheinen konstant und ubiquitär beteiligt zu sein. Die Topografie, die Morphologie und Struktur des Zahnes ist also ohne die Cadherine vielleicht nicht korrekt umsetzbar. Das würde sie zu einem wichtigen Faktor der Zahnentwicklung machen.

Zur Verifizierung der postulierten und diskutierten Funktionen der Cadherine bedarf es noch weiterführender Untersuchungen. Ein Ansatzpunkt sind Experimente mit Knockout-Mäusen. Mit diesen transgenen Tieren könnte ein bestimmtes Cadherin ausgeschaltet und die Folgen auf die Zahnentwicklung studiert werden. Dieser pathologische Prozess lässt so Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des entsprechenden Cadherins zu. Bei derartigen Experimenten ist jedoch zu beachten, dass diese Mausmutanten möglicherweise durch eine hohe Letalität die Untersuchung erschweren bzw. unmöglich machen. Beispielsweise erreichen Knockout-Mäuse, die homozygot für einen *Cdh2*-Defekt sind, maximal den zehnten Embryonaltag (Radice et al. 1997). Bei der Knockout-Maus ist deswegen eine Studie über die Folgen des *Cdh2*-Defekts auf die Zahnentwicklung nicht möglich. Aufgrund der höheren Überlebensrate wurden diese Folgen stattdessen beim Zebrafisch untersucht (Verstraeten et al. 2013). Alternativ sind daher bereits *in-vitro* Experimente mit Zahngewebe/Zahnanlagen durchgeführt worden (Schmitt et al. 1999, Akimoto et al. 2011). Problematisch sind dabei aber die fehlenden

physiologischen Bedingungen, die *in-vivo* vorhanden sind. Weiterführende Alternativen zum normalen Knockout könnten konditionale Knockoutexperimente und die Elektroporation sein. Dabei ließe sich das zu untersuchende Cadherin sowohl räumlich als auch zeitlich begrenzt bei der Odontogenese ausschalten. Eine Begrenzung der Genausschaltung auf die Zahnanlage bzw. ein bestimmtes Zeitfenster der Entwicklung könnte die frühe Letalität der Mäuse verhindern und die Untersuchung des entsprechenden Cadherins *in-vivo* ermöglichen. Derartige Experimente müssen also entsprechend sorgfältig geplant und durchgeführt werden, um effizient Ergebnisse zu produzieren und innerhalb der Richtlinien des Tierschutzgesetzes zu handeln.

Zusammenfassend hat diese Untersuchung einen ersten profunden Einblick in die Expression und mögliche Rolle der Cadherine während der Zahnentwicklung der Maus gegeben. Sie ist ein weiteres Beispiel dafür, wie komplex die Zahnentwicklung und die in diesem Zuge stattfindenden Prozesse sind. Die vorliegende Expressionsstudie kann eine wichtige Grundlage für weitere Experimente sein, in denen die Details der Zahnentwicklung und ihr Zusammenhang mit der Cadherinexpression näher untersucht werden.

## **8. Literatur- und Quellenverzeichnis**

- Akimoto T, Fujiwara N, Kagiya T, Otsu K, Ishizeki K, Harada H. 2011. Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 404:308-312.
- Bartlett JD, Dobeck JM, Tye CE, Perez-Moreno M, Stokes N, Reynolds AB, Fuchs E, Skobe Z. 2010. Targeted p120-catenin ablation disrupts dental enamel development. *PLoS One*, 5:e12703.
- Baum B, Georgiou M. 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 192:907-917.
- Biswas S, Emond MR, Jontes JD. 2010. Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *J Cell Biol*, 191:1029-1041.
- Bleicher F. 2014. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*, 325:65-71.
- Butler WT, Ritchie H. 1995. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*, 39:169-179.
- Byers S, Amaya E, Munro S, Blaschuk O. 1992. Fibroblast growth factor receptors contain a conserved HAV region common to cadherins and influenza strain A hemagglutinins: a role in protein-protein interactions? *Dev Biol*, 152:411-414.
- Cahill DR, Marks SC, Jr. 1982. Chronology and histology of exfoliation and eruption of mandibular premolars in dogs. *J Morphol*, 171:213-218.
- Cam Y, Fausser J-L, Vonesch J-L, Peterkova R, Peterka M, Halaskova M, Lesot H. 2002. Asymmetrical morphogenesis and medio-lateral positioning of molars during mouse development. *Eur J Oral Sci*, 110:35-43.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127:1671-1679.
- Clay MR, Halloran MC. 2014. Cadherin 6 promotes neural crest cell detachment via F-actin regulation and influences active Rho distribution during epithelial-to-mesenchymal transition. *Development*, 141:2506-2515.
- Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127:469-480.
- Cobourne MT, Sharpe PT. 2003. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol*, 48:1-14.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon

- AP. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75:1417-30.
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. 2001. FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 84:1656-1663.
- Fagotto F, Gumbiner BM. 1996. Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol*, 180:445-454.
- Fagotto F, Funayama N, Gluck U, Gumbiner BM. 1996. Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol*, 132:1105-1114.
- Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. 1998. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev*, 12:2636-2649.
- Gaitan Y, Bouchard M. 2006. Expression of the delta-protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo. *Gene Expr Patterns*, 6:893-899.
- Georgiou M, Baum B. 2010. Polarity proteins and Rho GTPases cooperate to spatially organise epithelial actin-based protrusions. *J Cell Sci*, 123:1089-1098.
- Gomez S, Boyde A. 1994. Correlated alkaline phosphatase histochemistry and quantitative backscattered electron imaging in the study of rat incisor ameloblasts and enamel mineralization. *Microsc Res Tech*, 29:29-36.
- Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. 2002. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*, 129:5323-5337.
- Gumbiner BM. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:622-634.
- Halbleib JM, Nelson WJ. 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 20:3199-3214.
- Harrison OJ, Bahna F, Katsamba PS, Jin X, Brasch J, Vendome J, Ahlsen G, Carroll KJ, Price SR, Honig B, Shapiro L. 2010. Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nat Struct Mol Biol*, 17:348-357.
- He P, Zhang Y, Kim SO, Radlanski RJ, Butcher K, Schneider RA, DenBesten PK. 2010. Ameloblast differentiation in the human developing tooth: Effects of extracellular matrices. *Matrix Biol*, 29:411-419.



- Hertel N, Redies C. 2011. Absence of layer-specific cadherin expression profiles in the neocortex of the reeler mutant mouse. *Cereb Cortex*, 21:1105-1117.
- Heuberger J, Birchmeier W. 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (2).
- Heymann R, About I, Lendahl U, Franquin JC, Obrink B, Mitsiadis TA. 2002. E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol*, 160:2123-2133.
- Hirano S, Yan Q, Suzuki ST. 1999. Expression of a novel protocadherin, OL-protocadherin, in a subset of functional systems of the developing mouse brain. *J Neurosci*, 19:995-1005.
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C. 2003. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci*, 8:d306-355.
- Hong S, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM. 2013. Binding to F-actin guides cadherin cluster assembly, stability, and movement. *J Cell Biol*, 201:131-143.
- Hovorakova M, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. 2005. The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryos. *Anat Embryol*, 209:303-313.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H. 2005. Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol*, 50:131-136.
- Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. 2007. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, 186:78-85.
- Huang XF, Chai Y. 2012. Molecular regulatory mechanism of tooth root development. *Int J Oral Sci*, 4:177-181.
- Inoue T, Chisaka O, Matsunami H, Takeichi M. 1997. Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryos. *Dev Biol*, 183:183-194.
- Jaffe SH, Friedlander DR, Matsuzaki F, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. 1990. Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out. *Proc Natl Acad Sci*, 87:3589-3593.
- Jernvall J, Thesleff I. 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 92:19-29.

- 
- Jernvall J, Thesleff I. 2012. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, 139:3487-3497.
- Jernvall J, Keranen SV, Thesleff I. 2000. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc Natl Acad Sci*, 97:14444-14448.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. 1994. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol*, 38:463-469.
- Katchburian E, Holt SJ. 1972. Studies on the development of ameloblasts: I. Fine structure. *J Cell Sci*, 11:415-447.
- Keranen SV, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J. 1999. Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol*, 209:495-506.
- Kettunen P, Thesleff I. 1998. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn*, 211:256-268.
- Kimura Y, Matsunami H, Inoue T, Shimamura K, Uchida N, Ueno T, Miyazaki T, Takeichi M. 1995. Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol*, 169:347-358.
- Koyama E, Wu C, Shimo T, Iwamoto M, Ohmori T, Kurisu K, Ookura T, Bashir MM, Abrams WR, Tucker T, Pacifici M. 2001. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Dev Dyn*, 222:178-191.
- Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. 2002. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*(-/-) mice. *Genes Dev*, 16:3173-3185.
- Larson EK, Cahill DR, Gorski JP, Marks SC, Jr. 1994. The effect of removing the true dental follicle on premolar eruption in the dog. *Arch Oral Biol*, 39:271-275.
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. 1996. A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 122:3185-3194.
- Leckband D, Prakasam A. 2006. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng*, 8:259-287.

- Leckband DE, de Rooij J. 2014. Cadherin adhesion and mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30:291-315.
- Lee JH, Nam H, Um S, Lee J, Lee G, Seo BM. 2014. Upregulation of GM-CSF by TGF-beta1 in epithelial mesenchymal transition of human HERS/ERM cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50:399-405.
- Lee TY, Lee DS, Kim HM, Ko JS, Gronostajski RM, Cho MI, Son HH, Park JC. 2009. Disruption of Nfic causes dissociation of odontoblasts by interfering with the formation of intercellular junctions and aberrant odontoblast differentiation. *J Histochem Cytochem*, 57:469-476.
- Lesot H, Brook AH. 2009. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*, 54:25-33.
- Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. 2001. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 15:8-13.
- Lien WH, Klezovitch O, Fernandez TE, Delrow J, Vasioukhin V. 2006.  $\alpha$ E-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. *Science*, 311:1609-1612.
- Lin J, Wang C, Redies C. 2013. Expression of multiple delta-protocadherins during feather bud formation. *Gene Expr Patterns*, 13:57-65.
- Linde A, Goldberg M. 1993. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4:679-728.
- Liu Q, Londraville R, Marrs JA, Wilson AL, Mbimba T, Murakami T, Kubota F, Zheng W, Fatkins DG. 2008. Cadherin-6 function in zebrafish retinal development. *Dev Neurobiol*, 68:1107-1122.
- Mammoto T, Mammoto A, Torisawa YS, Tat T, Gibbs A, Derda R, Mannix R, de Bruijn M, Yung CW, Huh D, Ingber DE. 2011. Mechanochemical control of mesenchymal condensation and embryonic tooth organ formation. *Dev Cell*, 21:758-769.
- Matsunami H, Miyatani S, Inoue T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M. 1993. Cell binding specificity of mouse R-cadherin and chromosomal mapping of the gene. *J Cell Sci*, 106:401-409.
- Matsuo S, Ichikawa H, Wakisaka S, Akai M. 1992. Changes of cytochemical properties in the Golgi apparatus during in vivo differentiation of the ameloblast in developing rat molar tooth germs. *Anat Rec*, 234:469-478.

- 
- Mendes Raquel V, Martins Gabriel G, Cristovão Ana M, Saúde L. 2014. N-cadherin locks left-right asymmetry by ending the leftward movement of Hensen's node cells. *Dev Cell*, 30:353-360.
- Mitsiadis TA, Graf D. 2009. Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87:199-211.
- Miyatani S, Shimamura K, Hatta M, Nagafuchi A, Nose A, Matsunaga M, Hatta K, Takeichi M. 1989. Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science*, 245:631-635.
- Mohamed SS, Atkinson ME. 1983. A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat*, 136:735-749.
- Morishita H, Yagi T. 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 19:584-592.
- Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haikel Y, Lesot H. 2008. Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res*, 87:1138-1143.
- Nejsum LN, Nelson WJ. 2007. A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity. *J Cell Biol*, 178:323-335.
- Nelson W, Daniel J, William I. 2013. Roles of cadherins and catenin in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. *Prog In Mol Biol Transl Sci*.116, 3-23.
- Niessen CM, Leckband D, Yap AS. 2011. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*, 91:691-731.
- Nollet F, Kools P, van Roy F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299:551-572.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54:993-1001.
- Obara N, Lesot H. 2007. Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell Tissue Res*, 330:461-473.
- Obara N, Suzuki Y, Nagai Y, Takeda M. 1998. Expression of E- and P-cadherin during tooth morphogenesis and cytodifferentiation of ameloblasts. *Anat Embryol*, 197:469-475.
- Perez TD, Nelson WJ. 2004. Cadherin adhesion: mechanisms and molecular interactions. *Handb Exp Pharmacol*, 165:3-21.

- 
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. 1994. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem*, 223:1019-1026.
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol*, 181:64-78.
- Rakshit S, Zhang Y, Manibog K, Shafriz O, Sivasankar S. 2012. Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci*, 109:18815-18820.
- Redies C, Vanhalst K, Roy F. 2005.  $\delta$ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, 62:2840-2852.
- Renaud-Young M, Gallin WJ. 2002. In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion. *J Biol Chem*, 277:39609-39616.
- Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. 1995. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39:51-68.
- Sasaki T, Garant PR. 1996. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec*, 245:235-249.
- Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P, Jr., Maeda T, Slavkin HC, Grosschedl R, Chai Y. 2005. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Dev Biol*, 278:130-143.
- Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:557-568.
- Schalm SS, Ballif BA, Buchanan SM, Phillips GR, Maniatis T. 2010. Phosphorylation of protocadherin proteins by the receptor tyrosine kinase Ret. *Proc Natl Acad Sci*, 107:13894-13899.
- Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV. 1999. Mouse odontogenesis in vitro: the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol*, 43:255-260.
- Shimazu Y, Sato K, Aoyagi K, Nango N, Aoba T. 2009. Hertwig's epithelial cells and multi-root development of molars in mice. *J Oral Biosci*, 51:210-217.
- Shimoyama Y, Tsujimoto G, Kitajima M, Natori M. 2000. Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J*, 349:159-167.

- 
- Smith CE. 1979. Ameloblasts: secretory and resorptive functions. *J Dent Res*, 58:695-707.
- Smith CE. 1998. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9:128-161.
- Smith CE, Nanci A. 1995. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol*, 39:153-161.
- Sorkin BC, Wang MY, Dobeck JM, Albergo KL, Skobe Z. 2000. The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. *J Histochem Cytochem*, 48:397-406.
- Stepniak E, Radice GL, Vasioukhin V. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1:a002949.
- Tai K, Kubota M, Shiono K, Tokutsu H, Suzuki ST. 2010. Adhesion properties and retinofugal expression of chicken protocadherin-19. *Brain Res*, 1344:13-24.
- Takeichi M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251:1451-1455.
- Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7:619-627.
- Takeichi M. 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*, 8:11-20.
- Taneyhill LA. 2008. To adhere or not to adhere: the role of cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr*, 2:223-230.
- Ten Cate AR. 1997. The development of the periodontium — a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000*, 13:9-19.
- Tepass U, Tanentzapf G, Ward R, Fehon R. 2001. Epithelial cell polarity and cell junctions in drosophila. *Annu Rev Genet*, 35:747-784.
- Thesleff I. 2003. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*, 116:1647-1648.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. 1995. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*, 39:35-50.
- Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. 2001. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 15:14-18.

- Tonge CH. 1969. The time-structure relationship of tooth development in human embryogenesis. *J Dent Res*, 48:745-752.
- Tucker A, Sharpe P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*, 5:499-508.
- Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, Redies C. 2005.  $\delta$ -Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cell Mol Life Sci*, 62:1247-1259.
- Verstraeten B, van Hengel J, Sanders E, Van Roy F, Huysseune A. 2013. N-cadherin is required for cytodifferentiation during zebrafish odontogenesis. *J Dent Res*, 92:365-370.
- Vleminckx K, Kemler R. 1999. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, 21:211-220.
- Wang XP. 2013. Tooth eruption without roots. *J Dent Res*, 92:212-214.
- Welsch U. 2003. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 1. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 311-312.
- Wheelock MJ, Johnson KR. 2003a. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 15:509-514.
- Wheelock MJ, Johnson KR. 2003b. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19:207-235.
- Wise GE, Fan W. 1989. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res*, 68:150-156.
- Wu Y, Hao YQ, Li JY, Zhou XD. 2010. Gene expression profiles of the incisor pulp tissue during fluorosis. *Int Endod J*, 43:629-636.
- Xiong J, Gronthos S, Bartold PM. 2013. Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontol 2000*, 63:217-233.
- Yoshida C, Takeichi M. 1982. Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, 28:217-224.
- Yoshida K. 2003. Fibroblast cell shape and adhesion in vitro is altered by overexpression of the 7a and 7b isoforms of protocadherin 7, but not the 7c isoform. *Cell Mol Biol Lett*, 8:735-741.

- Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P, Jr. 2003. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*, 228:651-663.
- Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin HC. 1995. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39:69-92.
- Zheng L, Ehardt L, McAlpin B, About I, Kim D, Papagerakis S, Papagerakis P. 2014. The tick tock of odontogenesis. *Exp Cell Res*, 325:83-89.



## 9. Anhang

### 9.1 Publikationshinweis

Teile dieser Arbeit werden in folgender Publikation Verwendung finden:

*Gudrun Stoya, Jonas Wagenknecht, Christoph Redies, Nicole Schmid-Hertel.  
Cadherinexpression during tooth development.*

Manuskript in Vorbereitung.

### 9.2 Lebenslauf

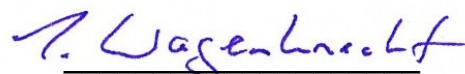
#### **Persönliche Daten**

Name	Jonas Wagenknecht
Geburtsdatum	15.09.1989
Geburtsort	Meiningen

#### **Schulischer/Beruflicher Werdegang**

Seit 2010	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2009 – 2010	Sprach- und Arbeitsaufenthalt in Neuseeland, Australien, Japan und den USA
Juli 2009	Abitur
2007 – 2009	Gymnasium Ernestinum in Celle
2006 – 2007	Austauschjahr an der Holland Hall Preparatory School in Tulsa, OK (USA)
2002 – 2006	Gymnasium Ernestinum in Celle
2000 – 2002	Orientierungsstufe Vorwerk in Celle
1996 – 2000	Grundschule Hehlentor in Celle

Jena, 22.6.2015



**Unterschrift**

### **9.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Redies für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas bedanken. Ihre Begeisterung, Unterstützung sowie konstruktive Kritik trug sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen, Dr. Nicole Schmid-Hertel und Dr. Gudrun Stoya, die mit viel Engagement, geduldigem Einsatz und großer Hilfsbereitschaft meine Arbeit unterstützt haben. Ich wurde in die Welt der Cadherine und des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt und merkte, dass die Forschung in keiner Weise trocken sein muss. Sie hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme, besonders bei unseren regelmäßigen Treffen und Diskussionsrunden im Zuge dieser Arbeit. Der Zeitaufwand, der oft über das normale Maß hinaus ging, ist nicht selbstverständlich. Das weiß ich sehr zu schätzen. Ohne diese Hilfe wäre die Arbeit nie zu dem geworden, was sie ist.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt den beiden medizinisch-technischen Assistentinnen Carolin Große und Dr. Manuela Schwalbe. Beide sind maßgeblich daran beteiligt, dass ich mich in diesem Institut von Anfang an wohl gefühlt habe. Trotz meiner Unerfahrenheit in experimenteller Arbeit haben sie mit großer Geduld meine ersten Schritte auf dem Gebiet begleitet und mir die Zeit im Labor wirklich angenehm werden lassen.

Bei Jens Geiling möchte ich mich herzlich für die graphische Unterstützung bedanken. Den großen Zeitaufwand, der hinter derartigen Grafiken steckt, weiß ich sehr zu schätzen. Sie sind ein wichtiger Teil der Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: Bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern. Eure permanente Unterstützung, euer immerwährendes Interesse an meinem Tun und die große Geduld, vor allem in Zeiten von Stress und Hektik macht mich unendlich dankbar. Ohne euch wäre nichts, was ich bisher erreicht habe, möglich gewesen.

## 9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. Dr. Christoph Redies
- Dr. Nicole Schmid-Hertel
- Dr. Gudrun Stoya
- Carolin Große (experimentelle Unterstützung)
- Dr. Manuela Schwalbe (experimentelle Unterstützung)
- Jens Geiling (graphische Unterstützung Abb.2)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22.6.2015



**Unterschrift**